

SANDRA REGINA MARTINI BRUN

**Participação de receptores angiotensinérgicos na ingestão de
água induzida pela injeção intracerebroventricular de
serotonina e angiotensina em pombos (*Columba livia*).**

Dissertação apresentada como
requisito parcial à obtenção do grau de
Mestre. Curso de pós-graduação em
Neurociências e Comportamento,
Centro de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Santa
Catarina.

Orientador: Prof. Dr. José Marino
Neto.

FLORIANÓPOLIS
1999

**“PARTICIPAÇÃO DE RECEPTORES ANGIOTENSINERGICOS NA
INGESTÃO DE ÁGUA INDUZIDA PELA INJEÇÃO ivc DE SEROTONINA
E DE ANGIOTENSINA EM POMBOS *Columba livia*”**

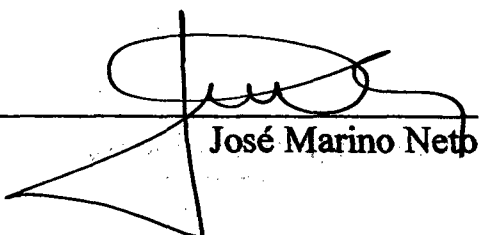
SANDRA REGINA MARTINI BRUN

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

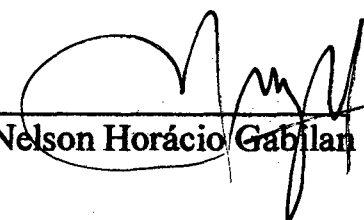
MESTRE EM NEUROCIÊNCIAS

na área de Neurofisiologia e Comportamento Aprovada em sua forma final
pelo Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

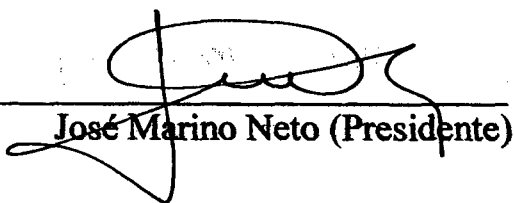
Orientador

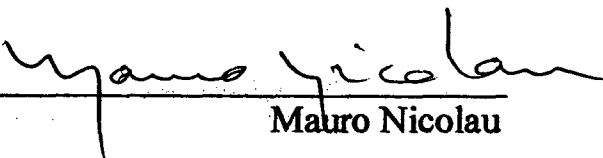

José Marino Neto


Coordenador do Curso


Nelson Horácio Gabilan

Banca Examinadora


José Marino Neto (Presidente)


Mauro Nicolau


Mariana Graciela Terenzi

Para:

Meu Pai

Pelos princípios inabaláveis que guiam sua vida

Minha Mãe

por fazer acreditar que somos capazes

Maurício

minha inspiração para ser sempre melhor

Meus filhos

Que fazem a vida ser ainda melhor

Minha família

Pelo apoio, compreensão e por seu amor.

Gostaria de agradecer:

Ao Professor Marino, pelos constantes ensinamentos que me fizeram crescer.

À Professora Marta, pelos auxílios e exemplo profissional dados durante o período de laboratório.

Aos meus pais, pelo constante incentivo e pela minha formação como ser humano.

Ao Prof. e amigo Aury Nunes de Moraes pelo incentivo e amizade.

À minha amiga especial Jana, pela constante demonstração de carinho e amizade, o que tornou tudo mais fácil.

À Sandra, pelo auxílio o que possibilitou a realização do presente trabalho.

À Bety, pela excelente companhia durante o tempo que aí estive.

À Lú, D. Vilma, Eliane, Nivaldo e Carlinhos pela amizade e excelente convívio.

Ao Nivaldo, secretário do Curso de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento, UFSC, pelo auxílio e atenção.

Aos professores e colegas da fisiologia e neurociências que colaboraram para a realização deste trabalho.

Aos amigos, pelo incentivo e compreensão.

“Golpe a golpe, passo a passo, caminhante, não há caminho, o caminho é feito ao andar. Andando, se faz o caminho e se você olhar para trás tudo que verá são as marcas de passos que algum dia seus pés tornarão a percorrer. Caminhante, não há caminho, o caminho é feito ao andar.”
Antônio Machado

SUMÁRIO

SUMÁRIO	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	9
ANIMAIS	10
IMPLANTAÇÃO DE CÂNULAS NO VENTRÍCULO CEREBRAL LATERAL	10
INJEÇÃO INTRACEREBROVENTRICULAR DE DROGAS	12
SOLUÇÕES ADMINISTRADAS NO VENTRÍCULO LATERAL	12
PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	13
REGISTROS COMPORTAMENTAIS	16
HISTOLOGIA	16
ANÁLISE DE DADOS	18
RESULTADOS	19
EXPERIMENTO 1 – EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO COM SALARASINA SOBRE OS EFEITOS INDUZIDOS PELA ANG II E PELA 5HT.	20
1.a - Comparação entre os efeitos comportamentais induzidos pela administração i.c.v. de Ang II e de 5-HT:	20
1.b – Efeitos do pré-tratamento com salarasinina sobre comportamentos envolvidos na ingestão de água induzidos pela Ang II e pela 5HT: ...	25

1.c – Efeitos do pré-tratamento com salarasinina sobre comportamentos não ingestivos induzidos pela Ang II e pela 5HT:	26
1.d – Efeitos do pré-tratamento com salarasinina em animais tratados com veículo:	27
2 - EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO COM PD123,319 SOBRE OS EFEITOS INDUZIDOS PELA ANG II E PELA 5-HT:	31
2-a - Ingestão de água:	31
2-b – Comportamentos não ingestivos:	32
2-c – Efeitos do pré-tratamento com PD123,319 em animais tratados com veículo:	33
3 - EFEITOS DO PRÉ-TRATAMENTO COM LOSARTAN SOBRE OS EFEITOS INDUZIDOS PELA ANG II E PELA 5-HT:	36
3-a- Ingestão de água:	36
3-b- Comportamentos não ingestivos:	37
3-c- Efeitos do pré-tratamento com Losartan em animais tratados com veículo:	38
DISCUSSÃO	41
BIBLIOGRAFIA	55

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo investigar efeitos da injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de Angiotensina II (Ang II) e de serotonina (5-HT) sobre comportamentos ingestivos e não ingestivos em aves, bem como examinar o efeito do pré-tratamento com antagonistas de receptores da Ang II sobre comportamentos produzidos por estes tratamentos. Os animais receberam 20 minutos antes o pré-tratamento com um antagonista, seguido do tratamento com Ang II ou com 5-HT. Com o objetivo de verificar possíveis efeitos provocados pelos antagonistas, foram realizados grupos que receberam como pré-tratamento uma dose do antagonista seguido do tratamento com veículo. Durante uma hora após os tratamentos, registros comportamentais foram realizados por meio de observação direta e sistemática das posturas e movimentos corporais executados pelo animal. Ao final de 1 hora de observação, o consumo de água foi quantificado. A administração tanto de Ang II como a de 5-HT provocaram uma intensa ingestão de água que ocorreu logo depois da aplicação das referidas drogas. Além disso, o perfil comportamental induzido pela injeção i.c.v. de Ang II ou de 5-HT foram similares, a administração de Ang II e de 5-HT provocaram sono, no entanto o sono provocado pela 5-HT é mais duradouro do que o sono provocado pela Ang II. O pré-tratamento com Sar¹Ala⁸ – angiotensina II (Sar, 0,01, 0,1 e 1 nmol, um antagonista não seletivo de receptores da Ang II) reverteu os efeitos dipsogênicos da Ang II e da 5-HT. No entanto doses maiores de Sar foram necessárias para bloquear a ingestão de água produzida pela injeção i.c.v. de Ang II. Os comportamentos não ingestivos produzidos pela Ang II e pela 5-HT não foram bloqueados pela administração de Sar. O pré-tratamento com um antagonista de receptores AT₁ (Losartan, 2 e 4 nmol) não bloqueou os efeitos

dipsogênicos e hipnogênico provocados pela injeção i.c.v. de Ang II e de 5-HT. O pré-tratamento com Losartan em animais tratados com veículo bloqueou a ingestão de água durante o período experimental. O pré-tratamento com um antagonista de receptores AT_2 (PD123,319, 2 e 4 nmol) não reverteu os efeitos dipsogênicos e hipnogênico produzidos pela administração da Ang II e da 5-HT. Nos animais tratados com veículo o PD123,319 (PD) bloqueou a ingestão de água durante o período experimental.

Nossos resultados sugerem que o efeito dipsogênico, mas não o hipnogênico, produzido pela 5-HT possa ser mediado pela ativação de sistemas angiotensinêrgicos. Tais efeitos dipsogênicos, tanto da Ang II como da 5-HT, parecem ser mediados por receptores angiotensinêrgicos que apresentam baixa afinidade pelos protótipos de antagonistas AT_1 (Losartan) e AT_2 (PD).

ABSTRACT

The objective of this study was to analyze the effects of intracerebroventricular (i.c.v.) injections of Angiotensin II (Ang II) and of serotonin (5-HT) on ingestive and non-ingestive behaviors of pigeons, as well as to examine the effect of the pre-treatment with Ang II receptor antagonists on behaviors produced by these treatments. Twenty minutes before treatment, the animals received pre-treatment with an antagonist followed by the treatment with Ang II or with 5-HT. To examine possible effects provoked by the antagonists alone, separated groups received a dose of the antagonist followed by the treatment with vehicle. During an hour after the treatments, behavioral recording were accomplished by means of direct and systematic observation of the postures and corporal movements executed by the animals. At the end of 1 hour of observation, the water intake was measured. The administration of Ang II as well as of 5-HT provoked an intense water intake that occurred just after the application of the referred drugs. Besides, the behavioral profiles induced by the i.c.v. injection of Ang II and of 5-HT were similar, as both treatments provoked sleep. However, sleep provoked by 5-HT was more intense and long lasting than the sleep provoked by Ang II. The pre-treatment with Sar¹,Ala⁸ - angiotensin II (Sar, 0,01, 0,1 and 1 nmol, a non-selective antagonist of receptors of Ang II) reverted both Ang II and of 5-HT dipsogenic effects. However, larger doses of Sar were necessary to block the intake produced by the i.c.v. injection of Ang II. The non-ingestive behaviors produced by Ang II and by 5-HT were not blocked by the administration of Sar. The pre-treatment with an antagonist of receptors AT₁ (Losartan, 2 and 4 nmol) did not blocked the dipsogenic and hypnogenic effects provoked by the i.c.v. injection of Ang II and

of 5-HT. The pre-treatment with Losartan on animals of the group control blocked the ingestion of water during the experimental period. The pre-treatment with an antagonist of receptors AT₂ (PD123319, 2 and 4 nmol) did not revert the dipsogenic and hypnogenic effects produced by Ang II and by 5-HT administration. On vehicle-treatment animals both the Losartan and PD blocked the spontaneous ingestion of water during the experimental period. Our results suggest that the dipsogenic effect, but not the hypnogenic ones, produced by 5-HT can be mediated by the activation of angiotensinergic systems. Such dipsogenic effects of Ang II as well as of 5-HT seem to be mediated by angiotensinergic receptors that present low affinity to the antagonists AT₁ (Losartan prototypes) and AT₂ (PD123, 319).

INTRODUÇÃO

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um dos principais mecanismos de controle cardiovascular e do balanço hidroeletrolítico nos mamíferos (Wright e Harding, 1995). O SRA periférico inclui o precursor, angiotensinogênio, produzido no fígado e presente na circulação sanguínea, que é clivado pela protease renina, secretada pelo rim; formando o decapeptídeo angiotensina I (Ang I) na circulação. A Ang I em seguida é convertida para o octapeptídeo Ang II pela enzima conversora de angiotensina (ECA) presente nos pulmões, que parece ser a primeira molécula biologicamente ativa nesta cascata (Johnston, 1990). A Ang II é formada a partir da Ang I pela simples reação de clivagem do C-terminal do dipeptídeo, His-Leu, pela ação da ECA (Skeggs e cols., 1956). A Ang II é convertida em heptapeptídeo Ang III, pela aminopeptidase A (Sakura e cols., 1983) e esta Ang III é convertida para o hexapeptídeo angiotensina IV, pela aminopeptidase B que cliva a arginina do N-terminal (Abhold e Harding, 1988).

Além do SRA periférico que produz a Ang II, outras formas de gerar Ang II foram investigadas, mostrando que os neurônios centrais possuem enzimas que sintetizam a Ang II (Dzau, 1988). Outros locais ainda possuem precursores da angiotensina, sugerindo a existência de um SRA parácrino nos rins, coração, vasos sanguíneos e cérebro (Campbell, 1985; Dzau, 1988; Ganten e cols., 1976).

A Ang II está envolvida em diferentes mecanismos neurais que incluem a regulação da secreção de hormônio antidiurético e da ingestão de água, na

regulação de parâmetros cardiovasculares, além de aspectos comportamentais vinculados a aprendizagem e a memória (Bulpitt e Fletcher, 1992; Saavedra, 1992; Wright e Harding, 1997). Além disso a Ang II tem um efeito hipertensivo central em adição ao efeito vasoconstritor periférico. Esta ação central foi demonstrada primeiramente por Bickerton e Buckley (1961) e confirmada repetidamente pela administração i.c.v. de Ang II. A influência da Ang II sobre a resistência vascular ocorre devido a ação direta sobre a musculatura lisa vascular e ação indireta via SNC pela estimulação do sistema nervoso simpático e liberação de vasopressina (Unger e cols., 1988; Wright e Harding, 1992).

A Ang II quando administrada centralmente em mamíferos também estimula a liberação de hormônios da pituitária e desencadeia rápida e vigorosa ingestão de água dose-dependente (Simon e cols., 1992; Wright e Harding, 1995; 1997). Estes efeitos estão relacionados com a presença de receptores que se ligam com Ang II com alta afinidade como o hipotálamo e órgãos circumventriculares (Speth e cols., 1985).

Técnicas imunohistoquímicas têm sido usadas para determinar os locais de distribuição de receptores da Ang II no cérebro de mamíferos (Lenkei e cols., 1997). Altas concentrações de receptores de Ang II foram identificadas no sistema límbico, no hipotálamo, no bulbo e na medula espinhal, sendo que no hipotálamo o núcleo paraventricular e núcleo supraóptico, demonstraram possuir terminações nervosas contendo alta densidade de receptores de Ang II (Lind, R.W., 1985). No rato as regiões mais sensíveis à administração de Ang II são o órgão subfornical e a região

anterodorsal do terceiro ventrículo (Simpson e cols., 1978) e o organum vasculosum da lamina terminalis na região anteroventral do terceiro ventrículo (Phillips, 1978).

Alguns análogos peptídicos da Ang II foram sintetizados e mostraram a capacidade de reverter alguns dos efeitos produzidos pela AngII. A Sar¹Ile⁸-Ang II é um protótipo deste tipo de antagonista (Timmermans e cols., 1993), exercendo atividade antagônica não seletiva sobre receptores angiotensinérgicos. Alguns compostos não peptídicos com atividade antagônica aos efeitos da Ang II revelaram a existência de subtipos de receptores angiotensinérgicos. Em mamíferos foram identificados e localizados pelo menos 3 tipos de receptores para a Ang II, denominados receptores AT1, AT2 e AT4, sendo os dois primeiros já subdivididos nos subtipos 1 A e 1B, 2 A e 2B (Wright e Harding, 1995).

O pré-tratamento i.c.v. com Losartan (ou DuP 753), um antagonista seletivo para receptores AT1 (Kirby e cols., 1992; Mathai e cols, 1997; Wong e cols., 1990), aboliu completamente a ingestão de água provocada por injeção i.c.v. de Ang II (Fregly e Rowland, 1991; Rowland e cols., 1992; Widdop e cols., 1994). Os receptores AT1 estão envolvidos em respostas pressoras e de ingestão de água produzidas pela Ang II (Hogarty e cols., 1992; Kirby e cols., 1992; Mathai e cols., 1997). Receptores AT2 também podem estar envolvidos no controle da ingestão de água; o pré-tratamento intracerebroventricular com um antagonista seletivo para receptores AT2, o PD123,319, reduziu a ingestão de água provocada por privação de água, hipovolemia e hipernatremia em ratos com pressão sangüínea normal

(Rowland e Fregly, 1993). Os receptores AT1 e AT2 se distribuem em locais conhecidos por participarem de funções cardiovasculares e do balanço hidroeletrolítico nas quais a Ang II participa. Estas estruturas incluem a área postrema, núcleo do trato solitário, órgão sub-fornical, organum vasculosum da lâmina terminalis, núcleo paraventricular e o núcleo pré óptico medial (Tsutsumi, 1991; Rowe e cols., 1992).

O SRA esta presente em aves, sendo que o peptídeo ativo em aves é val5-AngII, um análogo da ile5-AngII achado na maioria dos mamíferos. Ambos os peptídeos tem atividade biológica em aves e em mamíferos (Nakayama e cols., 1973; Evered e Fitzsimons, 1981). Esses dois análogos, equipotentes em suas atividades pressora (Khosla e cols., 1974) e dipsogênica em mamíferos (Fitzsimons e Johnson, 1978), foram igualmente potentes em estimular a ingestão de água em pombos (Fitzsimons e Johnson, 1978).

A distribuição de sistemas angiotensinérgicos no SNC (Sistema Nervoso Central) de aves parece ser comparável ao de mamíferos (Simon e cols., 1992). Estudos autoradiográficos demonstraram que a distribuição de receptores angiotensinérgicos no cérebro de aves assemelha-se ao observado em mamíferos (Natke e cols., 1996; Swanson, 1987). O sistema renina-angiotensina das aves, a exemplo do de mamíferos tem um papel importante sobre a homeostase hidroeletrolítica, incluindo o controle do comportamento ingestivo de água (Fitzsimons, 1979). Em perus, injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de Ang II causou intensa resposta dipsogênica (Denbow, 1985) e em frangos, a administração de Ang II dentro dos ventrículos laterais teve efeitos dipsogênicos (Snapir e cols., 1976). Os locais

do cérebro que a angiotensina II age provocando ingestão de água podem também ser similares em aves e mamíferos. Em pombos, o tratamento prévio com antagonistas peptídicos não-seletivos de receptores angiotensinérgicos (Sar¹,Ile⁸ e Sar¹,Leu⁸) atenuaram a resposta dipsogênica produzida pela injeção icv de Ang II (De Caro e cols., 1982), mas inexitem, até o momento, investigações estabelecendo o(s) subtipo(s) de receptores envolvidos nesta resposta em aves.

O controle da ingestão hídrica em mamíferos parece incluir a participação de mecanismos que utilizam a serotonina como mediador químico. Um potente efeito dipsogênico, provocado pela administração sistêmica de agonistas serotoninérgicos, tem sido demonstrado em ratos (Meyer e cols., 1974; Kikta e cols., 1983; Montgomery e cols., 1986). Este efeito dipsogênico depende da ativação do SRA periférico, bem como da integridade do órgão subfornical (Hubbard e cols., 1989) e do vago abdominal (Simansky e cols., 1982). Os efeitos de injeções centrais de agonistas serotoninérgicos sobre o comportamento ingestivo de água quase não tem sido relatado em mamíferos. Injeções icv de agonistas 5HT_{2a/2c} (MK 212) diminuíram a ingestão de água em ratos privados de água (Reis e cols., 1990a) e reduziram a ingestão de água induzida pela administração icv de Ang II e carbacol em ratos hidratados (Reis e cols., 1990b).

Achados recentes em nosso laboratório mostraram que a administração i.c.v. de serotonina (5-HT) em pombos provocou uma intensa ingestão de água (Milanez e cols., 1996; Steffens e cols., 1997). Tal resposta ocorre imediatamente após o tratamento com 5-HT e guarda correlação com

a dose de 5-HT aplicada. Injeções periféricas de 5-HT, equimolares às aquelas injetadas no ventrículo, não alteraram o comportamento ingestivo de água em pombos (Milanez e cols., 1996). Estes efeitos parecem ser mediados por receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} localizados centralmente (Steffens e cols., 1997). Injeções i.c.v. de um agonista 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT) em pombos privados de comida por 24 horas levou a um aumento de ingestão de água similar a ingestão provocada pela 5-HT (Steffens e cols., 1997), e indicam que circuitos serotoninérgicos podem exercer uma atividade inibitória tônica sobre a ingestão hídrica nestes animais. Estes dados sugerem também um importante envolvimento de circuitos serotoninérgicos centrais na regulação do equilíbrio hidrossalino em pombos, até então não descrito na literatura.

A ingestão de água desencadeada pela administração periférica de 5-HT em ratos parece ser dependente da ativação do sistema renina-angiotensina. A administração subcutânea de doses dipsogênicas de serotonina aumenta a atividade da renina plasmática e aumenta a concentração de renina e angiotensina I circulante (Meyer e cols., 1974; Barney e cols., 1981). A administração sistêmica de inibidores da enzima conversora de angiotensinogênio (captopril e MK 421, que diminuem a conversão de Ang I a Ang II) também bloqueiam o efeito dipsogênico provocado pela administração periférica de serotonina em ratos (Kikta e cols., 1983; Montgomery e Burton, 1986; Rowland e cols., 1987). Finalmente, a nefrectomia bilateral preveniu a ingestão de água induzida pela administração periférica de serotonina (Meyer e cols., 1974; Rowland e cols., 1987). Esses achados apontam para a existência de uma estreita relação entre

mecanismos serotoninérgicos e angiotensinérgicos periféricos no controle da ingestão de água em ratos.

É interessante notar que a magnitude e a latência após tratamento com que ocorrem os efeitos dipsogênicos da aplicação central de Ang II em pombos (e.g., De Caro e cols., 1982) são semelhantes aos que foram observados com a 5-HT (Steffens e cols., 1997), tornando possível a conjectura de que os efeitos dipsogênicos da 5-HT possam ser mediados, pelo menos parcialmente, por uma interação com sistemas angiotensinérgicos centrais em pombos.

Assim o presente trabalho tem por finalidade, comparar os efeitos dipsogênicos da 5HT e da Ang II em animais pré-tratados ou não com antagonistas seletivos (Losartan e PD123,319) e não seletivos (Sar¹Ala⁸ – angiotensina II) de receptores da Ang II. Uma vez que a 5HT provoca um quadro experimental pós-ingestivo que inclui efeitos hipnogênicos, além da avaliação do consumo de água, será realizado uma análise dos efeitos comportamentais dos tratamentos acima mencionados.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Para este trabalho foram utilizados pombos domésticos adultos (*Columba livia*) de ambos os sexos (300-500 gramas de peso corporal), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Antes e após a cirurgia, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, alojadas no biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas (CCB/CFS-UFSC), à temperatura ambiente, com água e ração *ad libitum*. A iluminação foi mantida artificialmente através de lâmpadas fluorescentes com ciclo claro/escuro de 12/12 horas e o período de escuro iniciando-se às 19:00 horas. Os experimentos foram realizados respeitando-se os princípios éticos de experimentação animal, postulados pelo COBEA (Colégio Brasileiros de Experimentação Animal, 1991).

Implantação de cânulas no ventrículo cerebral lateral

No mínimo 7 dias antes dos experimentos cada animal foi anestesiado (Equithesin, 0,15 ml/100g de peso corporal, IP) e fixado em um aparelho estereotáxico (Kopf Instruments, Inc.) por intermédio de barras posicionadas no conduto auditivo e no bico, com uma distância entre os dois pontos ajustada para 16mm e formando um ângulo de 45°. Na região de incisão foi administrado por via subcutânea, cerca de 0,2 ml de Xylestesin (cloridrato de lidocaína a 2%). Após assepsia com álcool iodado, uma incisão longitudinal foi realizada no escalpo, de tal forma a expor a calota craniana. O periósteo

foi removido com auxílio de bisturi, realizando uma raspagem, o crânio raspado e seco para garantir a adesão do acrílico. Ato contínuo, foi marcada a posição para a perfuração e implantação da cânula-guia, de acordo com coordenadas derivadas de um atlas estereotáxico para pombos (Karten e Hodos, 1967), plano frontal 6,0 mm anterior à linha interaural; plano sagital 1,0 mm lateral à sutura sagital; plano horizontal 6,0 mm abaixo da duramáter.

Na posição previamente determinada, foi feito orifício com cerca de 3 mm de diâmetro, com o auxílio de uma broca esférica de uso odontológico. A cânula-guia, feita a partir de um segmento de agulha hipodérmica, com 0,7 mm de diâmetro externo e 15 mm de comprimento, foi posicionada neste local, e o contato da mesma com o ventrículo foi indicado pela queda de pressão registrada em cm de água através um manômetro contendo solução fisiológica. Após a entrada no ventrículo, a cânula foi fixada à calota craniana por meio de parafusos e envolvida por acrílico autopolimerizável, formando um conjunto sólido capaz de resistir aos eventuais choques mecânicos com a gaiola e manipulação para injeções icv. Em cada cânula foi ajustado um mandril de aço inoxidável para evitar sua obstrução. A injeção icv das diferentes substâncias foi realizada em animais despertos, uma semana após a implantação da cânula-guia no ventrículo lateral.

Injeção intracerebroventricular de drogas

A injeção icv foi realizada por meio de uma agulha injetora (Mizzy-Slide-Park) introduzida na cânula-guia e conectada por um tubo de polietileno a uma microseringa Hamilton (10µl). Seu tamanho excede ao da cânula-guia em 1,0 mm. Com o objetivo de minimizar variações na pressão intraventricular as soluções foram administradas num período de 1 min.. O volume injetado foi sempre de 1 µl. O intervalo entre o pré-tratamento com o antagonista ou veículo e o tratamento com 5-HT, AngII ou veículo foi sempre de 20 minutos.

Soluções administradas no ventrículo lateral

De acordo com o pertinente a cada protocolo experimental, as seguintes drogas e doses foram utilizadas:

- ♦ 5-hidroxitriptamina, HCl (5-HT, Sigma), na dose de 155 nmol, dissolvida em ac. ascórbico 0,1% .
- ♦ Val⁵ – Angiotensina II (Ang II, Sigma), na dose de 0,1 nmol, dissolvida em solução salina 0,9%(veículo).
- ♦ Sar¹, Ala⁸ – Angiotensina II (salarasina, Sigma, antagonista não-seletivo de receptores da Ang II), nas doses de 1, 0,1 e 0,01 nmol dissolvidas em solução salina 0,9%(veículo).

- ♦ Losartan (Dup 753, Merk, Sharp & Dohme Gentilmente cedido pela Dra. Ana M. de Oliveira, FMRP-USP, antagonista seletivo de receptores AT₁ da Ang II), nas doses de 4 e 2 nmol dissolvidas em solução salina 0,9% (veículo).
- ♦ PD-123,319 (RBI, antagonista seletivo de receptores AT₂ da Ang II) nas doses de 4 e 2 nmol dissolvidas em solução salina 0,9% (veículo).

Protocolos experimentais

Todos os protocolos a seguir relacionados foram realizados após um mínimo de 7 dias da cirurgia de implantação das cânulas intraventriculares. Para cada experimento foram utilizadas no mínimo 8 preparações.

O Experimento 1 investigou possíveis efeitos do pré-tratamento com um antagonista não-seletivo de receptores da Ang II, Sar¹,Ala⁸–Angiotensina II (Sar), sobre comportamentos ingestivos e não ingestivos induzidos pela Ang II e pela 5HT, animais tratados com Ang II (n=8) e com 5HT (n=8) receberam pré-tratamento por via intracerebroventricular (icv) de Sar, nas doses de 0,01, 0,1 e 1 nmol. A sequência de experimentos (descritos na tabela 1) para cada animal foi distribuído de acordo com um esquema amostral em que o primeiro teste era feito com veículo + 5-HT ou veículo + Ang II. Os testes subsequentes foram distribuídos aleatoriamente para um mesmo animal. Com o intuito de investigar possíveis efeitos induzidos pela aplicação de Sar, isoladamente um grupo adicional de animais (n=8)

receberam como pré-tratamento 1 nmol de Sar icv seguido do tratamento com salina icv. Adicionalmente, este experimento teve também por objetivo comparar efeitos comportamentais induzidos pela Ang II e pela 5HT.

Resultados obtidos em experimentos realizados anteriormente mostraram que a aplicação central de 0,1 nmol de Ang II (Evered e Fitzsimons; 1976) ou 155 nmol de 5HT são capazes de produzir uma intensa ingestão de água, o volume de água ingerido pelos animais é semelhante após a aplicação das referidas doses. Portanto elegemos estas doses para efeito de comparação dos comportamentos induzidos pela administração central de Ang II e de 5HT.

Tabela 1 – Experimento 1

<i>5HT (n=8)</i>	<i>Ang II (n=8)</i>
Salina+Salina	Salina+Salina
Salina+5HT	Salina+Ang II
Sar 0,01nmol+5HT	Sar 0,01nmol+Ang II
Sar 0,1nmol+5HT	Sar 0,1nmol+Ang II
Sar 1,0nmol+5HT	Sar 1nmol+Ang II

No experimento 2 cada grupo recebeu como pré-tratamento uma dose do antagonista de receptores AT₂ (PD123,319), nas 2 doses mencionadas anteriormente, seguida da administração de 5-HT ou Ang II, ver tabela 1. Para verificar possíveis efeitos induzidos pela administração de PD123,319 (PD), um grupo adicional de pombos (n=8) recebeu como pré-tratamento 2 nmol do PD seguido do tratamento com salina.

Tabela 2 – Experimento 2

<i>5HT</i>	<i>Ang II</i>
Salina+5HT	Salina+Ang II
PD2nmol+5HT	PD2nmol+AngII
PD4nmol+5HT	PD4nmol+AngII

O experimento 3 investigou efeitos do pré-tratamento com Losartan sobre efeitos induzidos pela Ang II e pela 5HT. Os animais foram pré-tratados com Losartan, seguida do tratamento com Ang II ou 5HT (ver tabela 1). Para investigar possíveis efeitos induzidos pela administração de Losartan, um grupo adicional de animais (n=8) foi pré-tratado com 2 nmol de Losartan, seguido do tratamento com salina.

Tabela 3 – Experimento 3

<i>5HT</i>	<i>Ang II</i>
Salina+5HT	Salina+Ang II
Losartan2nmol+5HT	Losartan2nmol+AngII
	Losartan4nmol+Ang II

Cada tratamento ocorreu a intervalos de no mínimo 7 dias. O pré-tratamento com o antagonista ou veículo ocorreu 20 minutos antes do tratamento com Ang II ou 5-HT. Imediatamente após o tratamento tiveram início os registros comportamentais. Após 60 minutos, a quantidade de água ingerida foi avaliada.

Registros comportamentais

Nos dias de experimento, as gaiolas eram submetidas a limpeza, com 1 hora de antecedência ao experimento, removidos restos de ração e trocado o papel do assoalho das gaiolas.

Os registros dos comportamentos foram realizados através de uma janela de vidro pequena, de forma a permitir que o animal fosse observado sem que percebesse a presença do observador. Todos os procedimentos experimentais foram realizados entre 1000 e 1600h. Imediatamente após a injeção icv das drogas, nas séries experimentais 1, 2 e 3 (ver anteriormente), os animais retornaram às suas gaiolas. Neste momento, o bebedouro (contendo 100 ml de água) era reintroduzido na gaiola. Durante os 60 minutos subsequentes, foram registrados (em protocolos de papel) a duração e frequência dos comportamentos de ingestão de água, do comportamento exploratório, auto-limpeza, bem como das posturas típicas de sono (ver catálogo comportamental no Quadro 1), foram ainda registrados a latência para beber e latência para o primeiro episódio de sono. Ao final deste período, a quantidade total de água ingerida foram medidas em relação ao volume de água disponível no início do experimento.

Histologia

Terminados os experimentos, os pombos receberam uma dose letal de Equitesin, foram perfundidos transcordialmente com solução salina (NaCl

0,9%), seguida de solução de formol a 10%. Então foram decapitados, e antes de remover(dissecar) o cérebro, se injetou na cânula 0,1ml do corante azul de Evans. Os cérebros foram removidos e subseqüentemente cortados no plano transversal para se verificar a localização da cânula, por meio da presença do corante no sistema ventricular.

Quadro 1: Definições e códigos de registro dos eventos comportamentais

CODIGO	DESCRIÇÃO
BEBER	Inclui o comportamento de deglutição, quando o animal esta ingerindo água; mergulha o bico no bebedouro e realiza movimentos de deglutição
EXPLORAÇÃO	Inclui o complexo comportamental exploratório compreendido por postura alerta, movimentos de cabeça rápidos, movimentos palpebrais rápidos ou ausentes. Eventualmente ocorrem deslocamentos do animal dentro da gaiola;
AUTOLIMPEZA	Movimentos de esfregar o bico (ou bicar) nas penas de qualquer parte do corpo, movimentos de bater as asas semelhantes aos movimentos de voar, estando o pombo apoiado sobre uma superfície;
SONO	Animal quieto com olhos fechados, cabeça fletida e apoiada sobre o peito, retração do pescoço, penas do peito arrepiadas, eventualmente apoiado sobre apenas uma das pernas ou deitado sobre o piso da gaiola ou no poleiro.

Análise de Dados

Os dados relativos ao volume de água foram comparados estatisticamente por intermédio de uma análise de variância (ANOVA de uma via), seguidas pelo teste (post hoc) de Duncan. Os dados relacionados às categorias comportamentais (durações, latências) foram submetidos à análise não-paramétrica de Kruskal-Wallis (K.W.), seguida pelo teste pos-hoc de Mann-Whitney. O nível de significância adotado nesses procedimentos foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

No presente estudo foram investigados os efeitos comportamentais ingestivos e não ingestivos induzidos pela administração i.c.v. de 0,1 nmol de Ang II e 155 nmol de 5-HT. Além disso, foram investigados possíveis efeitos da aplicação i.c.v. em diferentes doses de antagonista seletivo e não- seletivo de receptores da Ang II sobre os comportamentos induzidos pela administração de Ang II e 5-HT .

Experimento 1 – Efeitos do pré-tratamento com salarasin sobre os efeitos induzidos pela Ang II e pela 5HT.

1.a - Comparação entre os efeitos comportamentais induzidos pela administração i.c.v. de Ang II e de 5-HT:

A aplicação de Ang II ou de 5-HT induziu padrões comportamentais comparáveis. Tanto o grupo que recebeu Vei+Ang II como o que recebeu Vei+5-HT apresentaram intensa ingestão de água [$F_{(2,21)} = 306,22$, $p < 1 \times 10^{-6}$]. Os volumes de água ingeridos após a aplicação de Ang II ($27,1 \pm 1,7$ ml, média \pm erro padrão da média) ou após a administração de 5-HT ($24,2 \pm 1,5$ ml) foram estatisticamente similares entre si e diferentes do veículo (veículo+veículo) ($1,62 \pm 0,37$ ml, ver Figura 1). Estes valores de ingestão provocados pela aplicação de Ang II ou 5-HT representaram aproximadamente 10% do peso corporal (os animais pesavam em torno de

300 g). No animais tratados com veículo+veículo o volume de água ingerido em uma hora correspondeu a aproximadamente 0,5% do peso corporal.

Os animais que receberam Ang II ou 5-HT ingeriam água mais cedo que o grupo tratado com veículo [$KW H_{(2,24)} = 13,98$, $p = 0,0009$](Figura 1). A latência para beber em animais tratados com Ang II ($87,1 \pm 15,2$ s) foi semelhante a dos tratados com 5-HT (120 ± 36 s), ambas foram menores que as observadas nos animais tratados com veículo (765 ± 183 s). A duração de beber também foi semelhante nos grupos tratados com Ang II ou 5-HT [$KW H_{(2,24)} = 15,20$, $p = 0,0005$](Figura 1), animais tratados com Ang II permaneciam em média 63 ± 6 s bebendo e o grupo que recebeu tratamento com 5-HT permaneciam em média $66 \pm 7,9$ s no bebedouro, durações estas estatisticamente similares. Ambas são diferentes do grupo controle, que permanecia em torno de $18 \pm 2,3$ s no bebedouro.

Os animais tratados com Ang II ou com 5-HT apresentaram semelhanças em outros comportamentos. Animais do grupo Ang II e animais do grupo 5-HT apresentaram posturas típicas de sono mais cedo quando comparados aos animais do grupo controle [$KW H_{(2,24)} = 6,59$, $p = 0,03$](Figura 2). No grupo tratado com Ang II a média da latência para o primeiro episódio de sono foi de 1473 ± 180 s e no caso do grupo tratado com 5-HT a média foi de $1238 \pm 99,4$ s. A latência para o primeiro episódio de sono foi estatisticamente similar entre os grupos tratado com Ang II ou 5-HT e diferente do grupo tratado com veículo (2124 ± 212 s). Durante o período experimental, a administração de Ang II ou de 5-HT fazia com que os pombos dormissem por um período bem mais longo comparado ao período

de sono do grupo controle (273 ± 64 s) [KW $H_{(2,24)}=14,26$, $p=0,0008$] como mostra a Figura 2. Além disso, a duração média de sono em animais tratados com Ang II (886 ± 175 s) foi significativamente menor que a observada nos animais tratados com 5-HT ($1135 \pm 128,6$ s).

Os pombos tratados com 5-HT ou com Ang II mostraram também diferenças significantes na duração de autolimpeza [KW $H_{(2,24)}=7,96$, $p=0,018$]. A duração de autolimpeza foi maior nos animais tratados com Ang II (598 ± 197 s) e nos animais tratados com 5-HT (302 ± 62 s), em animais tratados com veículo a duração de autolimpeza foi menor (112 ± 61 s, ver Figura 2). O tempo de duração da exploração foi menor no grupo tratado com Ang II e no grupo tratado com 5-HT [KW $H_{(2,24)}=9,46$, $p=0,008$] (Figura 2). A duração de exploração nos pombos que receberam Ang II foi em média de 2052 ± 190 s e nos tratados com 5HT foi em média 2065 ± 138 s, dados estes que mostram existir diferenças estatísticas do grupo controle onde o tempo de duração da exploração foi em torno de 2728 ± 115 s.

Em resumo nossos dados sugerem que o perfil ingestivo e comportamental provocado pela administração de doses de 5HT e Ang II aqui utilizadas são semelhantes em geral, mas indicam que a 5-HT provoca um efeito hipnogénico mais acentuado que o da Ang II.

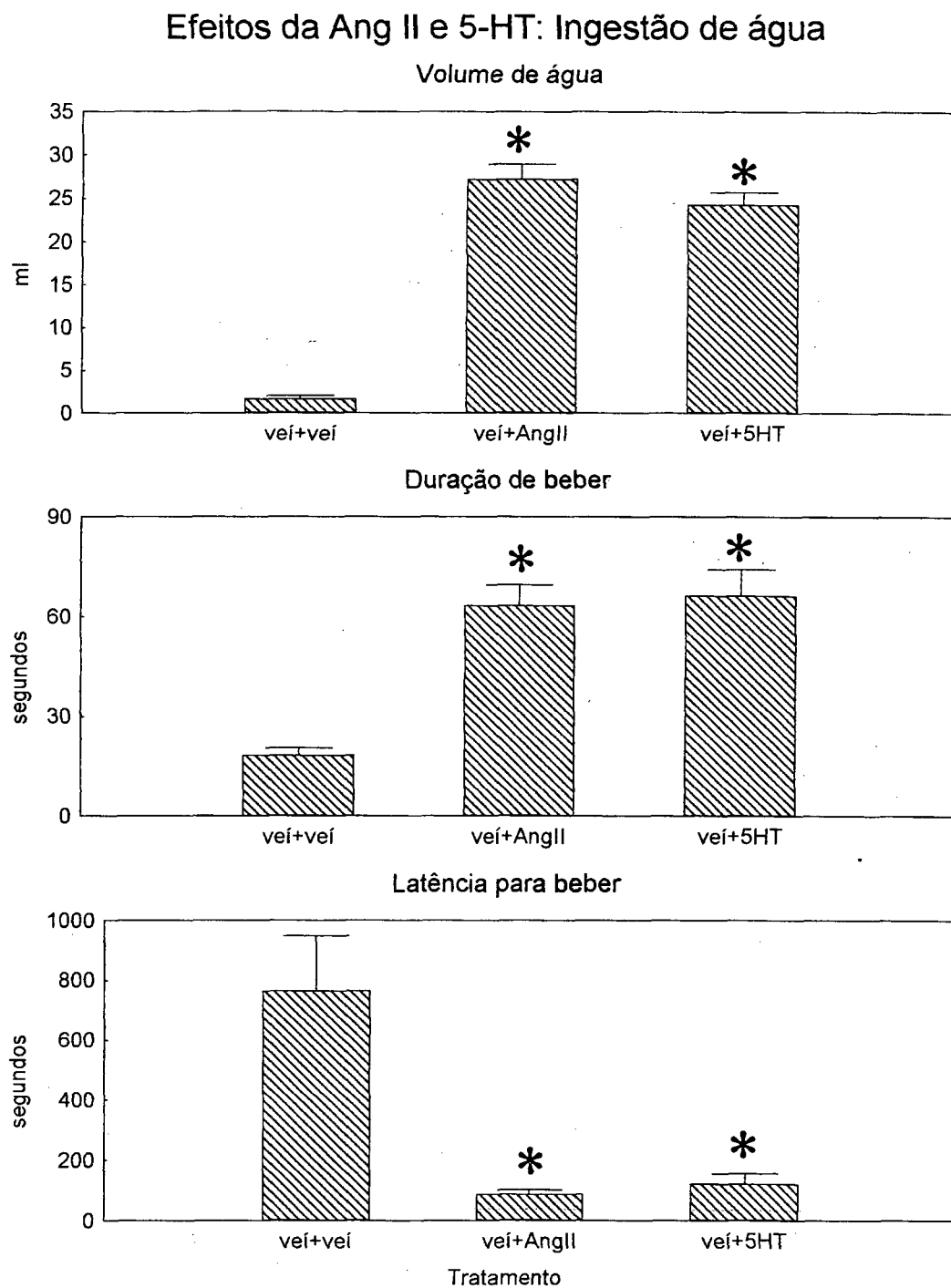


Fig. 1 – Efeitos da injeção i.c.v. de Ang II e 5-HT sobre a ingestão de água. Os tratamentos foram: veículo+veículo (veí+veí), veículo+ AngII (0,1 nmol, veí+AngII) e veículo+5-HT (155 nmol, veí+5-HT), o volume injetado foi sempre de 1 μ l. As colunas representam a média \pm erro padrão da média. (*) $p < 0,05$ em relação ao veículo.

Efeitos da Ang II e 5-HT: Comportamentos não-ingestivos

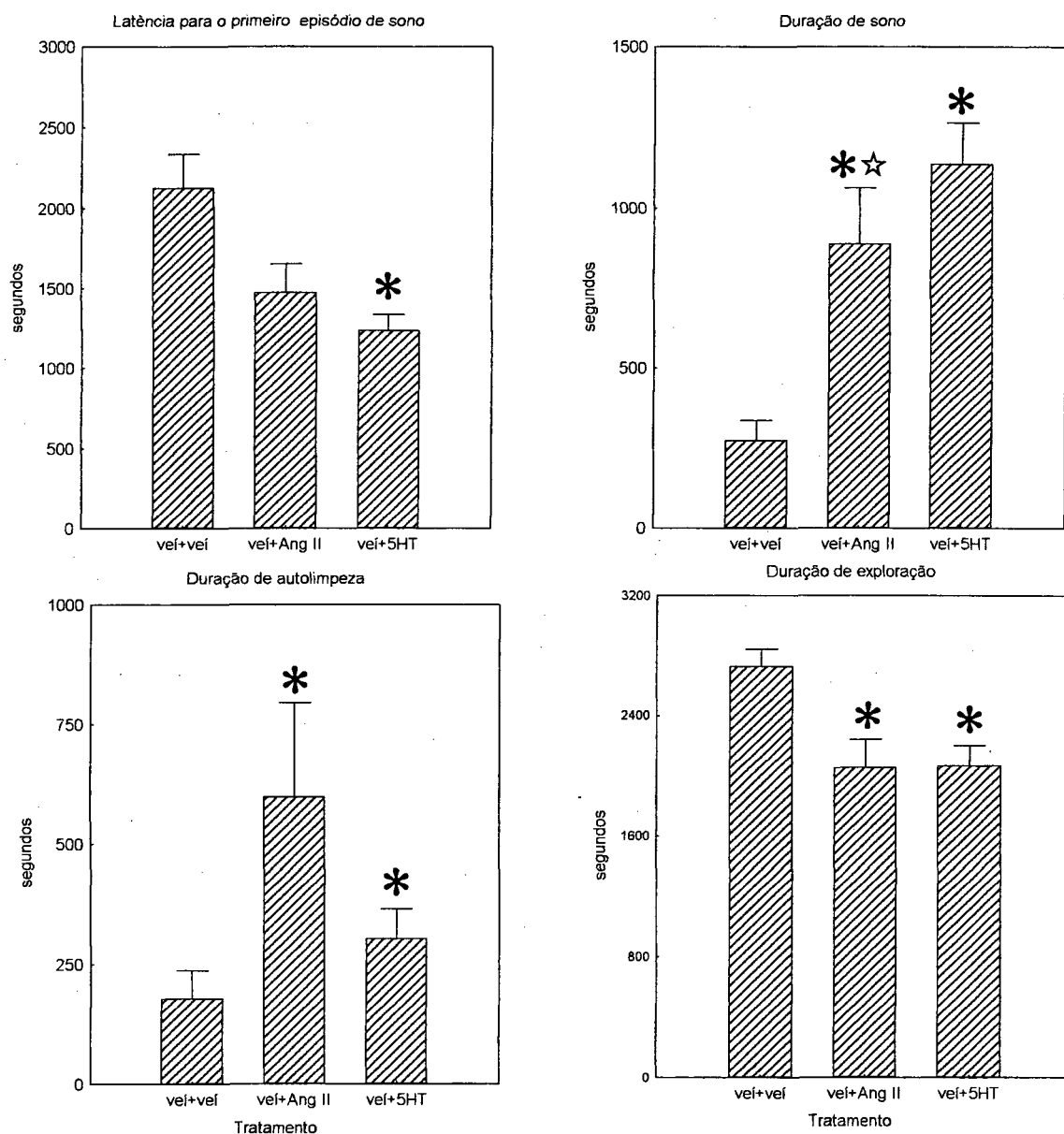


Fig. 2 – Efeitos da injeção i.c.v. de Ang II e 5-HT sobre comportamentos não ingestivos. Os tratamentos foram: veículo+veículo (veí+veí), veículo+ AngII (0,1 nmol, veí+AngII) e veículo+5-HT (155 nmol, veí+5-HT), o volume injetado foi sempre de 1 μ l. As colunas representam a média \pm erro padrão da média. (*) p < 0,05 em relação ao veículo, (☆) p < 0,05 em relação à 5HT.

1.b – Efeitos do pré-tratamento com salarásina sobre comportamentos envolvidos na ingestão de água induzidos pela Ang II e pela 5HT:

O pré-tratamento com Sar¹, Ile⁸ – angiotensina II (Sar) provocou uma diminuição no volume de água ingerido induzido pela Ang II [$F_{(5,42)}=34,06$, $p<1\times 10^{-6}$] (Figura 3). Animais tratados com Ang II que receberam pré-tratamento com 0,01 e 0,1 nmol de (Sar) ingeriram em média $26,4\pm 1,7$ ml e $21,4\pm 1,8$ ml de água respectivamente, o pré-tratamento com 1 nmol de Sar induziu uma ingestão de água em torno de $8,2\pm 3,4$ ml sendo este significativamente diferente do volume de água ingerido induzido pela Ang II. A Sar aumentou também a latência para beber na dose de 1 nmol [$KW H_{(5,48)}=17,82$, $p=0,003$], mas não houve diferenças significantes com o uso das doses menores de Sar (Figura 3). O pré-tratamento com 1 nmol de Sar provocou diminuição significativa na duração de beber ($26,87\pm 9,9$ s) [$KW H_{(5,48)}=20,84$, $p=0,0009$] induzida pelo tratamento com Ang II (63 ± 6 s, ver Figura 3). As outras doses de Sar não alteraram a duração de beber induzida pela Ang II.

A ingestão de água induzida pela 5-HT foi reduzida pelo pré-tratamento com 0,01 ($17,6\pm 3,2$ ml), 0,1 ($8,2\pm 2,5$ ml) e 1 nmol ($3,8\pm 2,37$ ml) de Sar [$F_{(5,42)}=21,36$, $p<1\times 10^{-6}$], ver Figura 3. As duas doses maiores reverteram completamente a ingestão induzida pela 5-HT, já que o volume ingerido pelos animais desses grupos foi semelhante ao volume ingerido pelos animais tratados somente com salina.

O pré-tratamento com 1 nmol de Sar, mas não de 0,1 e 0,01 nmol alterou a latência para beber induzida pela 5-HT [KW $H_{(5,48)}=14,71$, $p=0,01$] (Figura 3). O pré-tratamento com Sar provocou uma diminuição significativa na duração de beber induzida pela 5-HT [KW $H_{(5,48)}=15,19$, $p=0,009$], ver Figura 3. No grupo Sar 1 nmol – 5-HT a duração de beber foi de $16,2\pm6,5$ s e com 0,1 foi de $25,6\pm9$ s, mostrando existir diferença do grupo veículo-5HT

Em resumo, o pré-tratamento com Sar foi capaz de bloquear a ingestão de água induzida tanto pela Ang II como pela 5-HT. No entanto os dados mostram que doses menores de Sar são necessárias para atenuar a ingestão de água induzida pela 5-HT do que pela Ang II.

1.c – Efeitos do pré-tratamento com salarasin sobre comportamentos não ingestivos induzidos pela Ang II e pela 5HT:

O pré-tratamento com Sar não reverteu a latência para o primeiro episódio de sono em animais tratados com Ang II [KW $H_{(5,48)}=8,33$, $p=0,13$], ver Figura 4. A duração de sono induzida pela Ang II também não foi alterada pelo pré-tratamento com Sar [KW $H_{(5,48)}=16,35$, $p=0,005$], ver Figura 4. A Sar não provocou alterações na duração da autolimpeza [KW $H_{(5,48)}=18,34$, $p=0,002$] e da exploração [KW $H_{(5,48)}=9,37$, $p=0,09$] em animais tratados com Ang II, ver Figura 4.

O pré-tratamento com a dose de 0,01 nmol de Sar aumentou a latência para o primeiro episódio de sono (2178 ± 358 s) quando comparado aos animais tratados com 5-HT (1238 ± 99 s) [KW $H_{(5,48)}=11,19$, $p=0,04$], ver Figura

4. As outras doses de Sar não provocaram alterações significantes na latência para o primeiro episódio de sono. O pré-tratamento com Sar não diminuiu a duração de sono induzida pela 5-HT [KW $H_{(5,48)}=15,3$, $p=0,009$], ver Figura 4. O pré-tratamento com 0,01 nmol de Sar aumentou o tempo de autolimpeza induzida pela 5-HT [KW $H_{(5,48)}=22,24$, $p=0,0005$]. Quando os animais foram pré-tratados com 0,01nmol de Sar, a média da duração de autolimpeza foi de $690,6\pm 211$ s enquanto que no grupo tratado com veículo+5HT a média foi de 302 ± 62 s, ver Figura 4. O pré-tratamento com as diferentes doses de Sar não alterou o comportamento exploratório durante o período experimental [KW $H_{(5,48)}=5,89$, $p=0,31$], ver Figura 4.

Em resumo, o pré-tratamento com Sar não alterou os comportamentos latência de sono, duração de sono, autolimpeza e exploração induzidos pela administração de Ang II ou de 5-HT investigados neste experimento. O pré-tratamento com Sar aumentou a duração de autolimpeza em animais tratados com 5-HT.

1.d – Efeitos do pré-tratamento com salarásina em animais tratados com veículo:

Com o objetivo de verificar os efeitos da aplicação de Sar, os animais receberam 1 nmol de Sar seguida da administração de salina.

O pré-tratamento com Sar aumentou a duração da autolimpeza (Figura 4). A duração média da duração de autolimpeza de 112 ± 61 s do grupo tratado com veículo aumentou para 1011 ± 174 s quando pré-tratados com 1 nmol de

Sar. É importante notar que a administração de Sar não modificou a ingestão de água nos animais tratados com veículo.

Efeitos do pré-tratamento com Sar: Ingestão de água

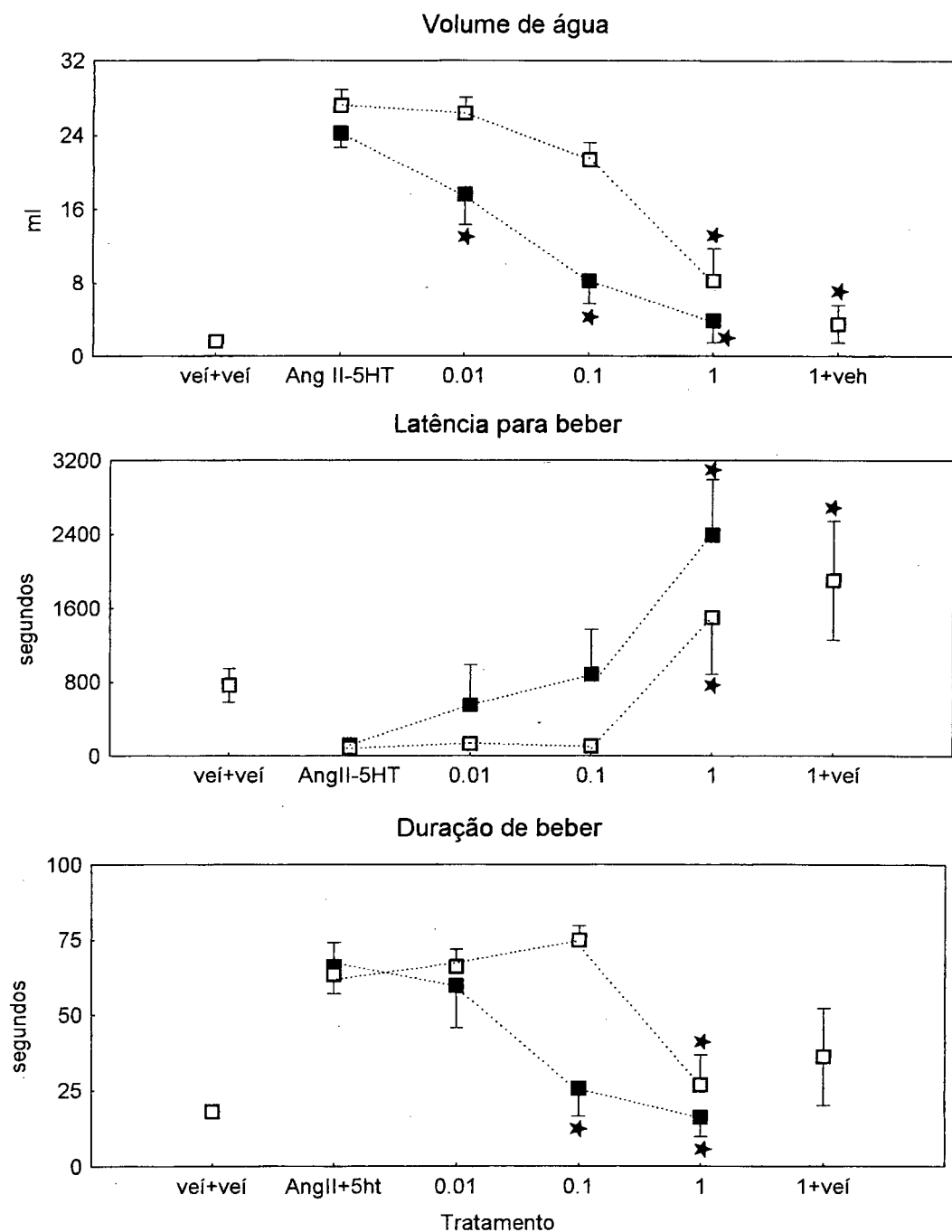


Fig. 3 – Efeitos do pré-tratamento com Sar¹,Ala⁸- Ang II (sar) sobre a ingestão de água induzidas pela Ang II e pela 5-HT: (■ - 5-HT, 155 nmol) (□ - Ang II, 0,1 nmol). Os tratamentos foram: veículo+veículo (vei+vei), sar 0,01 nmol+ Ang II ou 5HT (0,01), sar 0,1 nmol+Ang II ou 5HT (0,1), sar 1 nmol+AngII ou 5HT (1) e sar 1 nmol +veículo (1+vei), o volume injetado foi sempre de 1μl. Os pontos representam a média ± erro padrão da média. (★) p < 0,05 em relação ao grupo tratado com Ang II ou 5-HT.

Efeitos do pré-tratamento com Sar: Comportamentos não-ingestivos

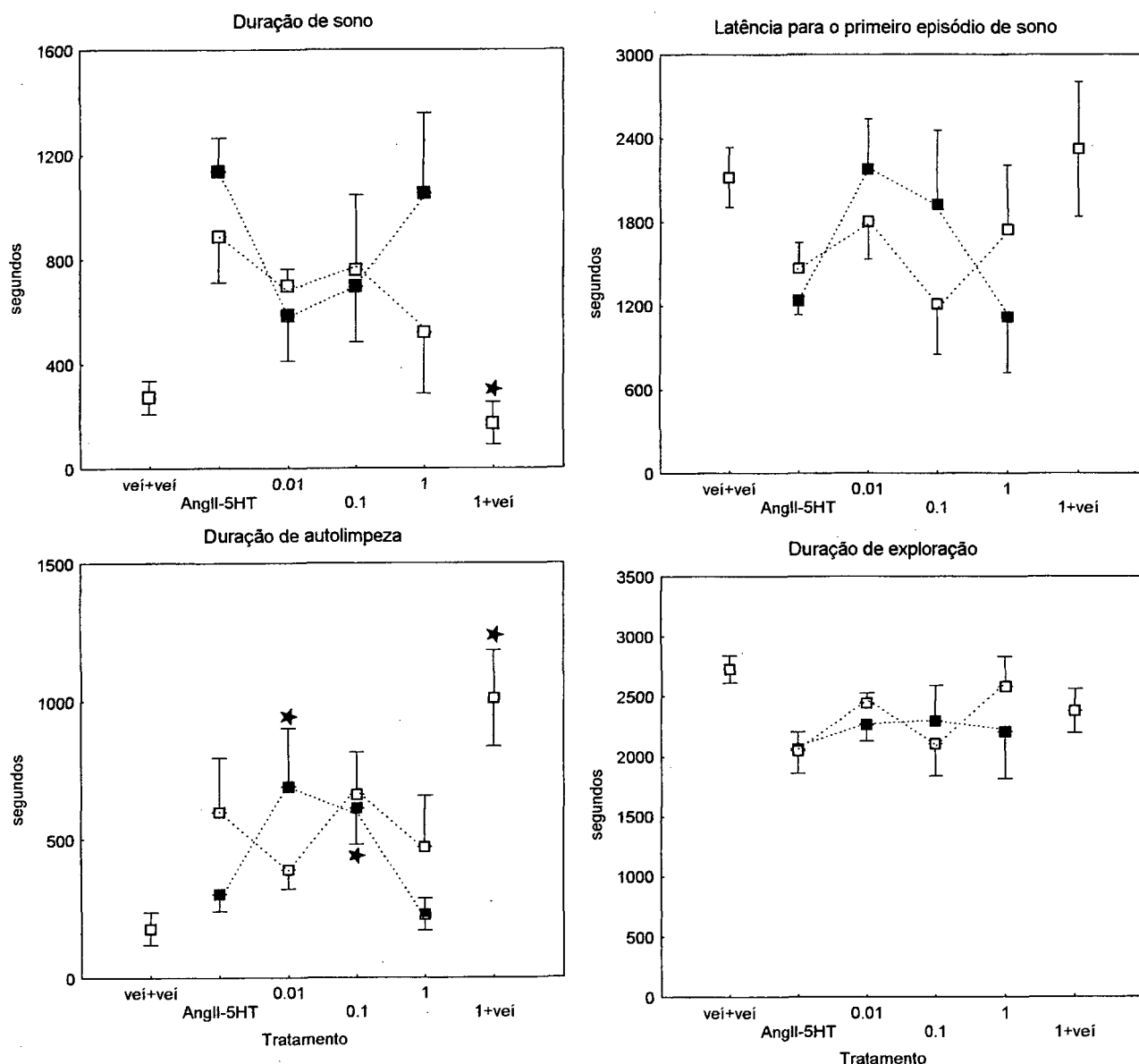


Fig. 4 – Efeitos do pré-tratamento com Sar¹,Ala⁸-Ang II (sar) sobre comportamentos não ingestivos induzidos pela Ang II e pela 5-HT: (■ - 5-HT, 155 nmol) (□- Ang II, 0,1 nmol) . Os tratamentos foram: veículo+veículo (vei+vei), sar 0,01 nmol+ Ang II ou 5HT (0,01), sar 0,1 nmol+Ang II ou 5HT (0,1), sar 1 nmol+AngII ou 5HT (1) e sar 1 nmol +veículo (1+vei), o volume injetado foi sempre de 1μl. Os pontos representam a média ± erro padrão da média. (★) p < 0,05 em relação ao grupo que tratado com Ang II ou 5-HT.

2 - Efeitos do pré-tratamento com PD123,319 sobre os efeitos induzidos pela Ang II e pela 5-HT:

2-a - Ingestão de água:

O pré-tratamento com 4 nmol de PD-123,319 (PD) atenuou o volume de água induzido pela Ang II [$F_{(4,35)}=65.50$, $p<1\times 10^{-6}$]. No grupo pré-tratado com 4 nmol de PD o volume de água ingerido foi de aproximadamente $19,7\pm 2,5$ ml e no grupo veículo+Ang II o volume foi em torno de $27,18 \pm 1,73$ ml, sendo esta diferença estatisticamente significativa, ver Figura 5B. Animais pré-tratados com 4 nmol de PD diminuíram a duração de beber ($34 \pm 9,9$ s) [$KW H_{(4,40)}=25,29$, $p<1\times 10^{-4}$] comparado ao grupo tratado com veículo+Ang II (63 ± 6 s), ver Figura 5D. O pré-tratamento com 2 nmol de PD diminuiu a latência para beber induzida pela Ang II [$KW H_{(4,40)}=31,64$, $p<1\times 10^{-4}$], ver Figura 5F.

O pré-tratamento com PD na dose de 2nmol provocou um aumento na ingestão de água ($33,9 \pm 5,4$ ml) em relação ao grupo veículo+5-HT ($24,2 \pm 1,5$ ml) [$F_{(4,35)}=21,52$, $p< 1\times 10^{-6}$], ver Figura 5A. No entanto o pré-tratamento com 4nmol de PD não aumentou do volume de água ingerido. O pré-tratamento com PD não mudou a latência de beber em animais tratados com 5-HT, [$KW H_{(4,40)} =28,78$, $p<1\times 10^{-4}$] além disso, a duração de beber também não mudou [$KW H_{(4,40)}=28,19$, $p< 1 \times 10^{-4}$], ver Figura 5C e Figura 5E.

Em resumo, o PD na dose maior atenua os efeitos dipsogênicos induzidos pela Ang II e o pré-tratamento com 2 nmol de PD aumentou o volume de água ingerido induzido pela 5HT.

2-b – Comportamentos não ingestivos:

O pré-tratamento com PD diminuiu a latência para sono induzida pela Ang [KW $H_{(4,40)}=21,95$, $p = 0,0002$], ver Figura 6B. Nos animais tratados com Ang II o pré-tratamento com as doses de 2 e 4 nmol de PD não alteraram a duração de sono [KW $H_{(4,40)}=10,59$, $p=0,03$] e autolimpeza [KW $H_{(4,40)}=10,15$, $p=0,03$], ver Figuras 6D e 6F. A duração de exploração diminuiu em animais pré-tratados com PD 2 e 4 nmol [KW $H_{(4,40)}=17,51$, $p=0,001$], ver Figura 6H.

O pré-tratamento com 4 nmol de PD diminuiu a latência para o primeiro episódio de sono induzido pela 5HT [KW $H_{(4,40)}=18,68$, $p=0,0009$], ver Figura 6A. O pré-tratamento com PD não reverteu a duração de sono induzida pela 5-HT [KW $H_{(4,40)}=9,38$, $p=0,05$], ver Figura 6C. Nenhuma das doses utilizadas do PD provocaram alterações na duração de autolimpeza [KW $H_{(4,40)}=6,52$, $p=0,16$] (Figura 6E) e exploração [KW $H_{(4,40)}=7,76$, $p=0,10$] (Figura 6G) induzidas pelo tratamento com 5-HT.

Em resumo, o pré-tratamento com PD diminuiu a latência para sono e duração de exploração em animais tratados com Ang II, em animais tratados com 5-HT o pré-tratamento com PD 4 nmol diminuiu a latência para sono.

2-c – Efeitos do pré-tratamento com PD123,319 em animais tratados com veículo:

Com o objetivo de verificar os efeitos da aplicação de PD os animais receberam como pré-tratamento 2 nmol de PD seguido de tratamento com salina. Durante o período experimental, os animais tratados com PD+salina não ingeriram água, o que levou à uma diferença na duração de beber (Figura 5C), comparado ao animais tratados com veículo+veículo. O pré-tratamento com PD não produziu resultados conclusivos quando se tratou da latência para sono (Figura 6A). O comportamento autolimpeza sofreu alterações em animais pré-tratados com PD (Figura 6E), no grupo pré-tratado com PD este comportamento teve duração média em torno de 611 ± 228 s e no grupo tratado com veículo+veículo foi em média $112 \pm 61,5$ s.

Em resumo, o PD inibiu a ingestão de água durante o período experimental em animais tratados com veículo o que ocasionou aumento da latência para beber e diminuiu a duração de beber. Além disso, diminuiu a latência para o sono e aumentou a duração da autolimpeza.

Efeitos do pré-tratamento com PD-123,319: Ingestão de água

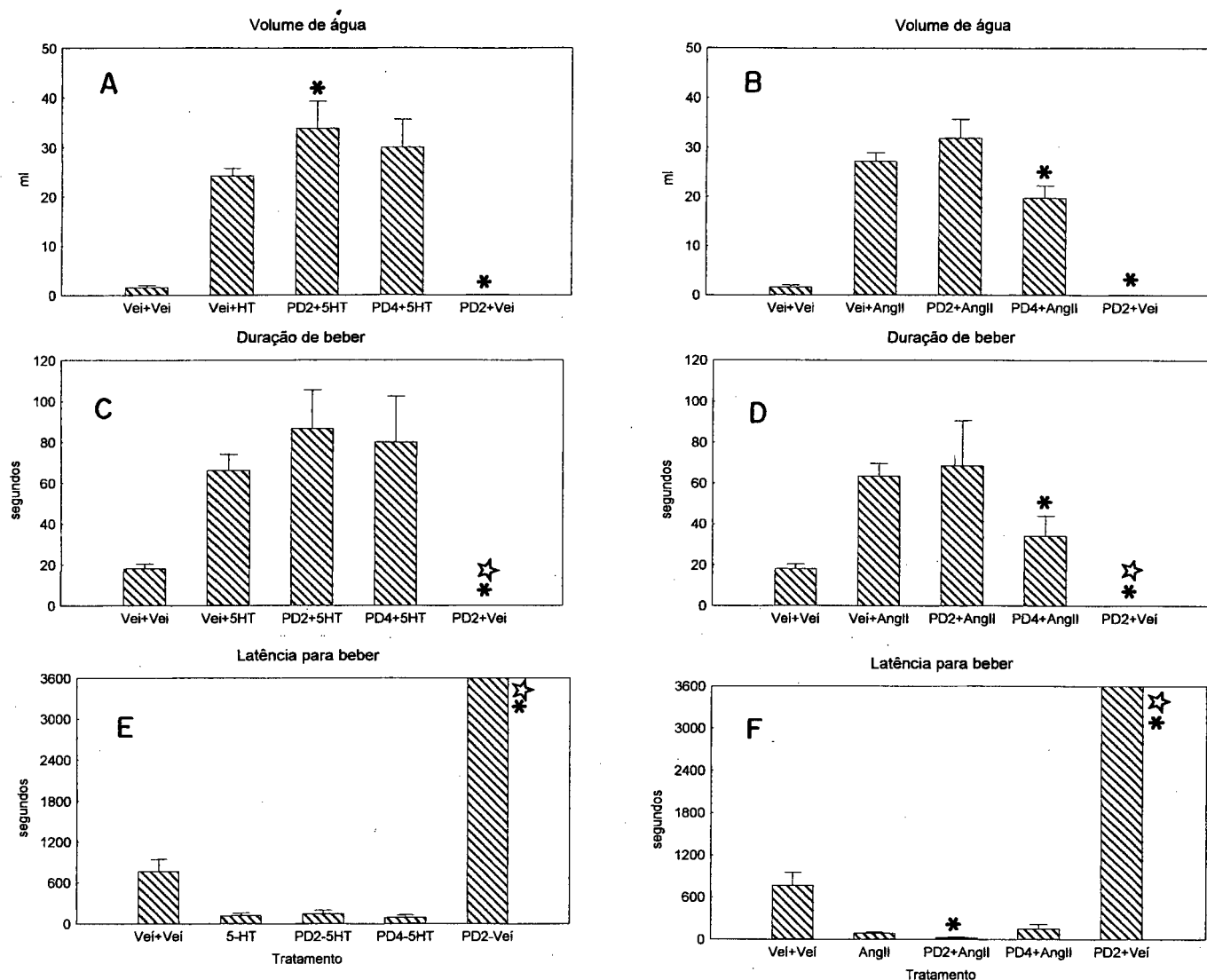
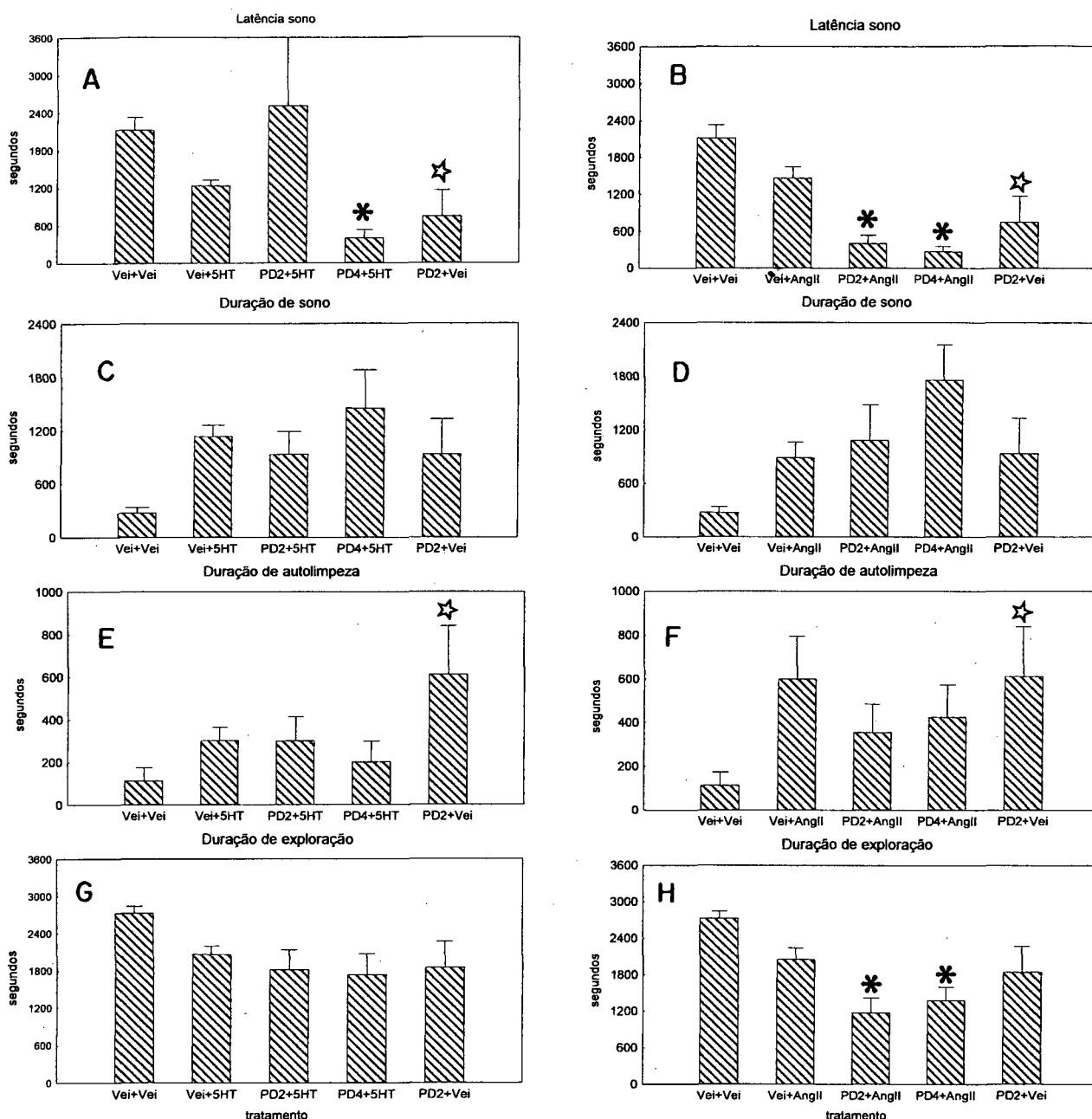


Fig. 5 – Efeitos do pré-tratamento com PD 123,319 sobre a ingestão de água induzidas pela Ang II e pela 5-HT. Fig. A, C e E: administração i.c.v. de veículo+veículo (Vei+Vei), veículo+5HT (155 nmol, Vei+5HT), PD 2nmol+5HT (155 nmol, PD2+5HT), PD 4nmol+5HT (155 nmol, PD4+5HT) e PD 2nmol+veículo (PD2+Vei). Fig. B, D e F: administração i.c.v. de veículo+AngII (0,1 nmol, Vei+AngII), PD 2nmol+AngII (0,1 nmol, PD2+AngII), PD 4nmol+AngII (0,1 nmol, PD4+AngII) e PD 2nmol+veículo (PD2+Ve). O volume injetado foi sempre de 1 μ l. (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com Ang II ou 5HT, (☆) $p < 0,05$ em relação ao veículo.

Efeitos do pré-tratamento com PD-123,319: Comportamentos não-ingestivos



3 - Efeitos do pré-tratamento com Losartan sobre os efeitos induzidos pela Ang II e pela 5-HT:

3-a- Ingestão de água:

O pré-tratamento com Losartan não reverteu a ingestão de água induzida pela Ang II, [$F_{(4,35)}=85,53$, $p<1\times 10^{-6}$], ver Figura 7B. Animais pré-tratados com Losartan não alteraram a latência para beber induzida pela Ang II [$KW H_{(4,40)}=25,18$, $p<1\times 10^{-4}$], ver Figura 7F. A duração de beber induzida pela Ang II também não sofreu alterações com o pré-tratamento de Losartan, [$KW H_{(4,40)}=28,13$, $p<1\times 10^{-4}$], ver Figura 7D.

O pré-tratamento com Losartan não reverteu o volume de água ingerido induzido pela 5-HT, [$F_{(3,28)}=16,80$, $p<1\times 10^{-5}$], ver Figura 7A. O pré-tratamento com 2 nmol de Losartan aumentou a latência para beber induzida pela 5-HT [$KW H_{(3,32)}=21,25$, $p=0,0001$], ver Figura 7E. O pré-tratamento com Losartan não reverteu a duração de beber induzida pela 5-HT [$KW H_{(3,32)}=21,54$, $p=0,0001$], ver Figura 7C.

Em resumo, o pré-tratamento com Losartan não reverteu os efeitos dipsogênicos produzidos pela administração de Ang II ou 5-HT. Animais pré-tratados com Losartan aumentaram a latência para beber induzida pela administração de 5-HT, mas a duração de beber e o volume de água não sofreram alterações.

3-b- Comportamentos não ingestivos:

O pré-tratamento com 2 mas não com 4 nmol diminuiu a latência para o sono induzida pela Ang II, [KW $H_{(4,40)}=13,10$, $p=0,01$], ver Figura 8B. Animais que receberam 2 nmol de Losartan+Ang II dormiram por um período mais longo que animais tratados com veículo+ Ang II [KW $H_{(4,40)}=19,38$, $p=0,0007$]. A duração de sono em animais pré-tratados com 2 nmol de Losartan foi aproximadamente 1709 ± 521 s comparado aos animais tratados com veí+Ang II que demorava em torno de 886 ± 175 , ver Figura 8D. Os comportamentos autolimpeza [KW $H_{(4,40)}=7,97$, $p=0,09$] e exploração [KW $H_{(4,40)}=17,30$, $p=0,001$] nos grupos Ang II não foram alterados pelo pré-tratamento com Losartan, como mostram as Figuras 8F e 8H.

Os animais tratados com 5-HT, quando pré-tratados com Losartan não mostraram possuir diferenças no comportamento latência para o sono [KW $H_{(3,32)}=7,23$, $p=0,064$], ver Figura 8A. O comportamento duração de sono, induzido pelo tratamento com 5-HT, não sofreu alterações com o pré-tratamento de Losartan 2 nmol [KW $H_{(3,32)}=9,44$, $p=0,02$], ver Figura 8C. Além disso a duração de autolimpeza [KW $H_{(3,32)}=3,75$, $p=0,28$] e exploração [KW $H_{(3,32)}=6,92$, $p=0,07$] não sofreram modificações quando os animais receberam o pré-tratamento com Losartan 2 nmol, (Figuras 8E e 8G).

Em resumo, o pré-tratamento com Losartan diminuiu a latência para o primeiro episódio de sono, aumentou a duração de sono e diminuiu a duração de exploração induzido pela Ang II. O pré-tratamento com Losartan não alterou comportamentos não ingestivos induzidos pelo tratamento com 5-HT.

3-c- Efeitos do pré-tratamento com Losartan em animais tratados com veículo:

O pré-tratamento com Losartan em animais tratados com veículo bloqueou a ingestão de água durante o período de observação, o que provocou um aumento da latência para beber ($p=0,01$) e diminuiu a duração de beber ($p=0,01$), (Figura 7C e Figura 7E).

Efeitos do pré-tratamento com Losartan: Ingestão de água

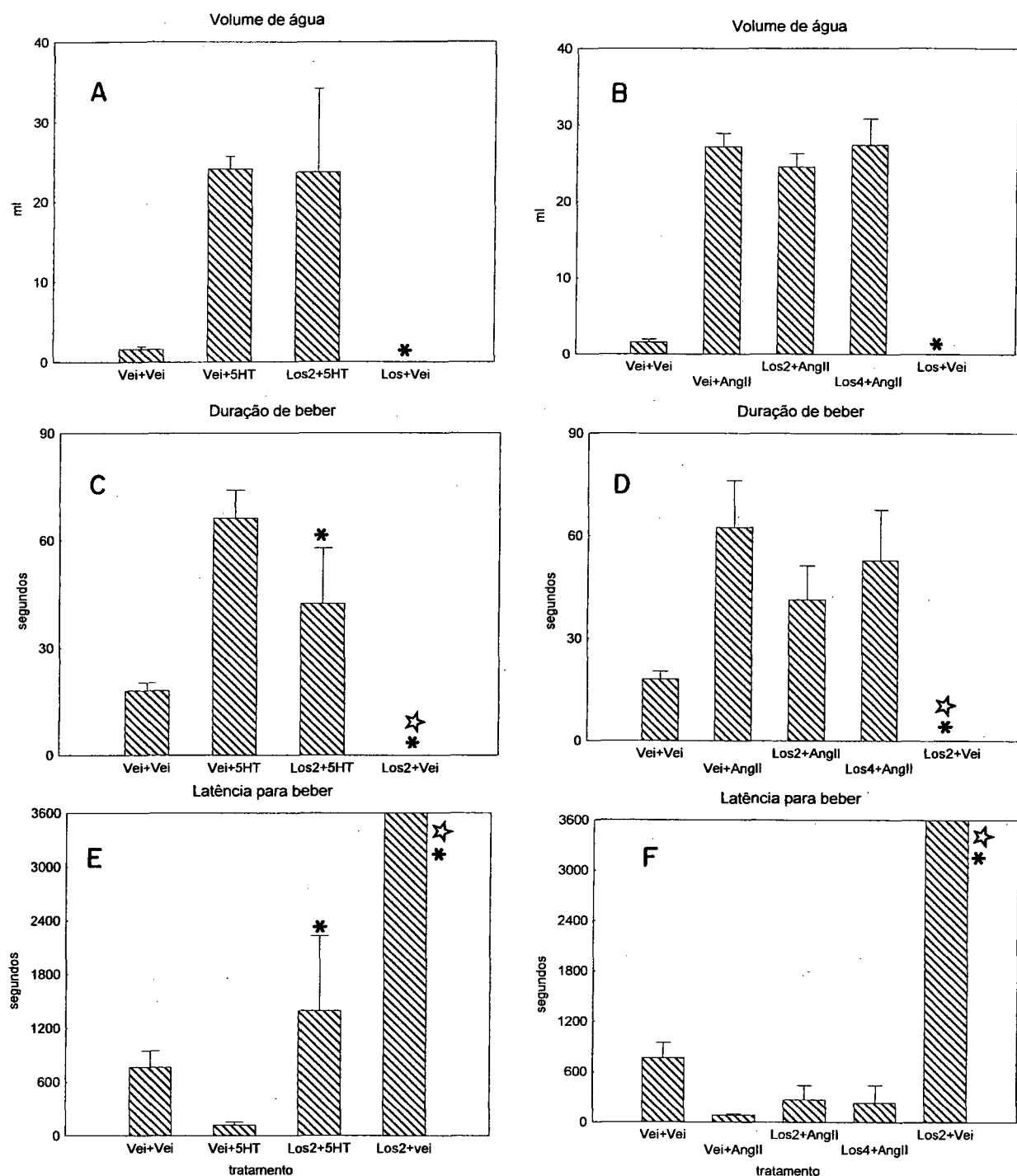


Fig. 7 – Efeitos do pré-tratamento com Losartan sobre a ingestão de água induzidas pela Ang II e pela 5-HT. Fig. A, C e E: administração i.c.v. de veículo+veículo (Vei+Vei), veículo+5HT (155 nmol, Vei+5HT), Losartan 2nmol+5HT (155 nmol, Los2+5HT), e Losartan 2nmol+veículo (Los2+Vei). Fig. B, D e F: administração i.c.v. de veículo+veículo (ve+ve), veículo+AngII (0,1 nmol, Vei+AngII), Losartan 2nmol+AngII (0,1 nmol, Los2+AngII), Losartan 4nmol+AngII (0,1 nmol, Los4+AngII) e Losartan 2nmol+veículo (Los2+Vei). O volume injetado foi sempre de 1µl. (*) p < 0,05 em relação ao grupo Ang II ou 5HT, (☆) p < 0,05 em relação ao veículo.

Efeitos do pré-tratamento com Losartan: Comportamentos não ingestivos

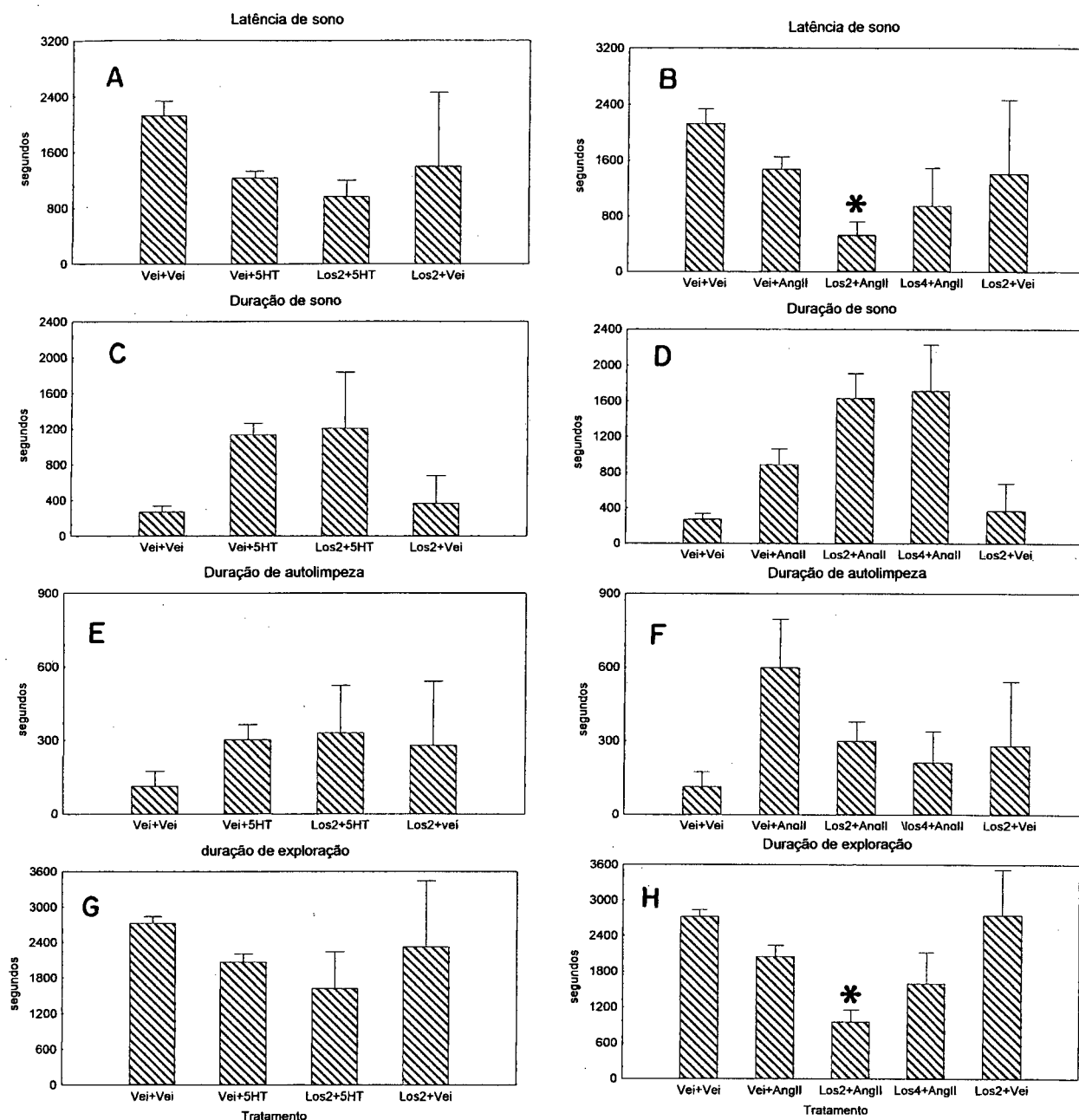


Fig. 8 - Efeitos do pré-tratamento com Losartan sobre comportamentos não ingestivos induzidos pela Ang II e pela 5-HT. Fig. A, C, E e G: administração i.c.v. de veículo+veículo (Vei+Vei), veículo+5HT (155 nmol, Vei+5HT), Losartan 2nmol+5HT (155nmol, Los2+5HT) e Losartan 2nmol+veículo (Los2+Vei). Figuras B, D, F e H: administração i.c.v. de veículo+AngII (0,1nmol (Vei+AngII), Losartan 2nmol+AngII-0,1nmol (Los2+AngII), Losartan 4nmol+AngII-0,1nmol(Los4+AngII) e Losartan 2nmol+veículo (Los2+Vei), o volume injetado foi sempre de 1µl. (*) p < 0,05 em relação ao grupo tratado com Ang II ou 5H.

DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho mostram que a administração i.c.v. de Ang II ou de 5-HT, nas doses aqui utilizadas, provocam uma intensa ingestão de água que alcança valores equivalentes a 10% do peso corporal. Além de provocarem a ingestão de volumes de água semelhantes, estes tratamentos provocam perfis de comportamento ingestivo similares, isto é, os animais tratados com AngII ou com 5-HT apresentaram latências igualmente curtas para o seu início e foram acompanhadas por aumento similares em sua duração total. Estes achados podem sugerir que mecanismos similares poderiam ser ativados pela Ang II e pela 5-HT para desencadear a ingestão de água.

A administração de Ang II por via intravenosa, no tronco encefálico rostral ou no terceiro ventrículo, é capaz de provocar intensa ingestão de água em papagaios (Wada e cols., 1975), pombos (Evered e Fitzsimons, 1976, 1981a; Kaufman e Peters, 1980; Barraco e cols., 1984), codornas (Takei 1977a; Kobayashi e Takey, 1982), galinhas (Snapir e cols., 1976, Schwob e Johnson, 1977), patos (De Caro e cols., 1980) e perus (Denbow, 1985). Resultados obtidos em pombos (Evered e Fitzsimons, 1981b) e codornas (Kobayashi e Takei, 1982) mostram que os sítios periventriculares dentro da área pré-ótica ventral são estruturas alvo envolvidas na ação dipsogênica produzida pela Ang II. Além disso, injeções de Ang II no órgão sub-fornical e no terceiro ventrículo (em regiões próximas à junção com os ventrículos laterais) são particularmente efetivas em provocar a ingestão de água (Takei, 1977b). Receptores da Ang II em perus localizam-se principalmente no hipotálamo, incluindo o órgão sub-fornical, a área pré-ótica ventral e a região AV3V (Gerstberger e cols., 1987). A Ang II presente na

corrente sangüínea atua em neurônios do órgão sub-fornical, considerado como o alvo mais provável de ação dipsogênica da Ang II em mamíferos e aves (Fitzsimons, 1980). Experimentos realizados em pombos mostraram que, à semelhança do que ocorre em mamíferos, o efeito dipsogênico produzido pela Ang II é diminuído após lesões no órgão sub-fornical (Thrasher e cols., 1982; Massi e cols., 1986). Tal lesão também atenua a ingestão de água provocada pela hipovolemia aguda, em contra partida a privação de água como um estímulo dipsogênico envolvendo a hiperosmolaridade não foi prejudicada (Massi e cols., 1986). Assim, parece ser consenso na literatura a idéia de que o efeito dipsogênico produzido pela administração de Ang II requer a ativação de alvos angiotensinérgicos centrais (Simon e cols., 1992).

A aplicação i.c.v. de Sar, um antagonista não seletivo de receptores da Ang II, bloqueou os efeitos dipsogênicos tanto da Ang II quanto da serotonina. Estes dados apoiam as evidências de De Caro e cols. (1982), que observaram que a injeção i.c.v. de Sar e de outros análogos da Ang II em pombos bloqueia a ingestão de água provocada pela administração central de Val⁵-AngII ou de Ile⁵-Ang II. Tal bloqueio foi observado após a aplicação de uma dose de Sar 100 vezes maior que a de Ang II. Deve ser notado que, no presente trabalho, observamos um bloqueio total da ingestão de água provocada pela Ang II com uma dose de Sar 10 vezes menor que a utilizada por De Caro e cols. (1982). É importante notar, adicionalmente, que a Sar não provocou um aumento da ingestão de água quando aplicada em animais tratados com veículo. A baixa atividade da Sar como agonista parcial, encontrada no presente estudo, confirmam os achados de De Caro e cols.

(1982), que não observaram aumentos da ingestão de água em pombos tratados i.c.v. com a Sar (Sar¹, Ala⁸ - Ang II, o análogo utilizado no presente estudo) ou com Sar¹, Gly⁸ - Ang II, nas doses de 1 e 10 nmol. No entanto, a administração i.c.v. da Sar¹, Ile⁸ - Ang II ou da Sar¹, Leu⁸ - Ang II mostraram possuir atividade como agonistas parciais da Ang II, isto é; produziram um aumento da ingestão de água em animais tratados com salina (De Caro e Cols., 1982).

A aplicação central de Sar também suprimiu, aparentemente de modo dose-dependente, o efeito dipsogênico induzido pela injeção i.c.v. de 5-HT. Além disso, é interessante notar que as doses de Sar necessárias para bloquear a ingestão de água desencadeada pela 5-HT foram menores que as necessárias para bloquearem os efeitos dipsogênicos da Ang II. Enquanto somente a dose de 1 nmol de Sar foi capaz de bloquear a ingestão de água em animais tratados com Ang II, os animais tratados com 5-HT apresentaram redução da ingestão de água após o pré-tratamento com as 3 doses de Sar utilizadas (0,01, 0,1 e 1 nmol). Estes dados podem sugerir que 1) mecanismos angiotensinérgicos podem mediar o efeito dipsogênico da serotonina (isto é, uma possível ação da serotonina seria a de ativar o sistema renina-angiotensina central ou periférico, desencadeando a ingestão de água) e 2) que os mecanismos angiotensinérgicos ativados pelo tratamento com serotonina são mais efetivamente bloqueados pelo tratamento com a Sar do que os mecanismos angiotensinérgicos ativados pelo tratamento com a Ang II.

Um extenso volume de dados indica que a aplicação periférica de 5-HT ou de agonistas de receptores serotoninérgicos pode aumentar substancialmente a ingestão de água em ratos (e.g. Hubbard e cols., 1989; Kikta e cols., 1983; Menani e Johnson, 1995; Meyer e cols., 1974; Montgomery e cols., 1986). Além disso, a aplicação de metisergida, um antagonista de receptores 5-HT_{1/2}, foi capaz de reverter o efeito dipsogênico produzido pela administração de 5-HT (Meyer e cols., 1974).

A ingestão de água desencadeada pela administração periférica de 5-HT em ratos parece ser dependente da ativação do sistema renina-angiotensina. A administração subcutânea de doses dipsogênicas de serotonina aumenta a atividade da renina plasmática e aumenta a concentração de renina e angiotensina I circulante (Meyer e cols., 1974; Barney e cols., 1981). A administração sistêmica de inibidores da enzima conversora de angiotensinogênio (captopril e MK 421, que diminuem a conversão de Ang I a Ang II) também bloqueiam o efeito dipsogênico provocado pela administração periférica de serotonina em ratos (Kikta e cols., 1983; Montgomery e Burton, 1986; Rowland e cols., 1987). Finalmente, a nefrectomia bilateral preveniu a ingestão de água induzida pela administração periférica de serotonina (Meyer e cols., 1974; Rowland e cols., 1987). Esses achados apontam para a existência de uma estreita relação entre mecanismos serotoninérgicos e angiotensinérgicos periféricos no controle da ingestão de água em ratos.

Por outro lado, manipulações farmacológicas que aumentam a atividade serotoninérgica central parecem ter um efeito inibitório sobre a

ingestão de água em mamíferos. A administração i.c.v. de MK-212, um agonista de receptores 5-HT_{1c/2}, diminuiu a ingestão de água em ratos privados de água (Reis e cols., 1990a) e reduziu a ingestão de água induzida pela injeção i.c.v. de Ang II e carbacol em ratos hidratados (Reis e cols., 1990b). Além disso, a administração de metisergida na área parabraquial potencia a ingestão de água e NaCl provocada pela administração central de Ang II (Colombari e cols., 1996).

É importante notar que, enquanto a administração central de 5-HT em pombos provoca uma significativa ação dipsogênica (Steffens e cols., 1997, ver também os resultados do presente trabalho), a administração periférica de doses de 5-HT proporcionais às aquelas injetadas centralmente foram incapazes de desencadear ingestão de água nesta ave (Steffens e cols., 1997). Assim, parece que um mecanismo periférico de controle serotoninérgico sobre a ingestão de água, como o encontrado em mamíferos, está ausente em pombos. Além disso, nossos dados sugerem que o papel de circuitos serotoninérgicos centrais na regulação da ingestão de água em pombos é oposto ao observado em mamíferos. Investigações adicionais se fazem necessárias para esclarecer o papel de circuitos serotoninérgicos centrais sobre a ingestão de água tanto em aves quanto em mamíferos.

É importante salientar que sistemas angiotensinérgicos e serotoninérgicos parecem interagir no controle de fenômenos vinculados a outros mecanismos envolvidos no balanço hidroeletrólítico em mamíferos. Saydoff e cols., (1996) mostram que a administração central de serotonina é capaz de estimular a secreção de vasopressina através da ativação de

mecanismos mediados por circuitos angiotensinérgicos centrais. A administração de agonistas de receptores 5-HT₂ estimula a secreção de renina (e.g. Dugovic, 1992; Rithtenhouse e cols., 1991; Van de Kar e cols., 1989). A administração periférica de agonistas 5-HT₂ em mamíferos causou vasoconstrição renal; tal efeito levou a uma redução do fluxo sanguíneo glomerular produzindo um aumento da liberação de renina (Bond e cols., 1989; Takahashi e cols., 1991; Endlich e cols., 1993). Estes dados evidenciam a existência de uma estreita interação entre estes dois sistemas no controle de diversos fenômenos envolvidos com o balanço hidroeletrólítico.

O bloqueio produzido pela Sar sobre os efeitos dipsogênicos produzidos pela injeção i.c.v. de Ang II ou de serotonina estabelece a participação de receptores angiotensinérgicos no controle da ingestão de água provocada tanto pela Ang II como pela serotonina. No entanto, como a Sar é um antagonista não-seletivo de receptores angiotensinérgicos, seria interessante identificar que subtipos de receptores angiotensinérgicos estariam envolvidos na resposta dipsogênica em pombos. Com o objetivo de identificá-los, os animais foram pré-tratados com dois diferentes antagonistas seletivos de receptores da Ang II com afinidade por receptores AT₁ (Losartan) e AT₂ (PD-123,319) de mamíferos.

O pré-tratamento, por via i.c.v., com Losartan não bloqueou o efeito dipsogênico da serotonina e da Ang II. É interessante notar que as doses utilizadas de Losartan foram de 2 e 4 nmol, sendo assim duas e quatro vezes maiores que as doses utilizadas de Sar. No entanto, na dose de 1 nmol a Sar

foi capaz de diminuir significativamente a ingestão de água produzida tanto pela injeção i.c.v. de serotonina como de Ang II. O pré-tratamento com 2 nmol de Losartan bloqueou a ingestão de água durante 1 hora do período experimental em animais tratados com veículo. Esse bloqueio da ingestão de água em animais tratados com veículo poderia estar associado ao efeito do Losartan sobre uma possível liberação, tônica e em pequenas quantidades, de Ang II endógena. De acordo com esta especulação, esta ação tônica de sistemas angiotensinérgicos poderia manter a ingestão contínua de pequenas quantidades de água, típicas do pombo com livre acesso à água. A grande dose de Losartan injetada seria suficiente para antagonizar a ação desta pequena quantidade de Ang II endógena, mas não de afetar os efeitos produzidos pela administração de uma dose maciça de Ang II exógena injetada i.c.v. ou mesmo à possível liberação de Ang II endógena desencadeada pela administração central de serotonina.

A ingestão de água induzida pelo tratamento com Ang II foi atenuada pelo pré-tratamento com o PD, mas não ocorreu um bloqueio como o evidenciado pelo pré-tratamento com 1 nmol de Sar. Estes mesmos tratamentos com PD não afetaram a ingestão de água provocada pela serotonina. Deve ser ressaltado que também neste caso as doses utilizadas de PD são até 4 vezes superiores às doses de Sar que bloquearam a ingestão de água produzida tanto pela Ang II como pela serotonina. À semelhança do que foi observado com o Losartan, em animais tratados com veículo o pré-tratamento com PD bloqueou a ingestão de água, sugerindo que o PD é capaz de bloquear o efeito dipsogênico provocado por uma

possível liberação tônica de pequenas quantidades de Ang II em animais saciados.

Dados obtidos em mamíferos mostram que tanto o PD quanto o Losartan revertem os efeitos dipsogênicos provocados pela administração central e periférica de Ang II. Em ratos submetidos a jejum hídrico e hipovolemia (mecanismos estes que estimulam a liberação de renina e consequentemente aumentam a angiotensina II) reduziram a ingestão de água quando tratados com PD (Rowland e Fregly, 1993). Achados em mamíferos demonstram ainda que o PD-123,177 e o Losartan revertem a resposta dipsogênica produzida pela administração central de Ang II, sugerindo a participação de receptores AT_1 e AT_2 sobre esta resposta dipsogênica da Ang II (e.g., De Pasquale e cols., 1992; Fregly e Rowland, 1992; Hogarty e cols., 1992; Wong e cols., 1990).

De maneira contrastante com os achados em mamíferos, nossos resultados demonstraram que os efeitos dipsogênicos produzidos pela Ang II e pela serotonina não foram bloqueados pelo PD e pelo Losartan. Estes resultados podem indicar que em aves podem existir outros receptores envolvidos na resposta dipsogênica produzida pela Ang II, ou ainda que estes compostos não interagem com os receptores angiotensinérgicos de aves da mesma forma que o fazem com os receptores AT_1 e AT_2 de mamíferos.

Os receptores para a Ang II têm sido clonados em diversas espécies de mamíferos (e.g. Murphy e cols., 1991; Sasaki e cols., 1991; Bergsma e cols., 1992; Sasamura e cols., 1992; Iwai e Inagami, 1992), de anfíbios (Sandberg e cols., 1991) e de aves (Murphy e cols., 1993). Estes receptores

da Ang II em anfíbios e aves são funcionalmente similares aos receptores AT₁ de mamíferos(Ji e cols., 1994). Contudo, estes receptores diferem dos receptores de mamíferos por conter partes que não reconhecem o Losartan ou outros antagonistas específicos para receptores AT₁ de mamíferos (e.g. Murphy e cols., 1993; Ji e cols., 1993). Achados de Nishimura e cols. (1994) em galinhas domésticas, demonstram que a administração de Ang II provoca um aumento da pressão arterial e que tal efeito, dose dependente, não é alterado pelo pré-tratamento com Losartan ou PD. Estes resultados e os resultados do presente trabalho parecem apontar para a existência de diferenças entre receptores angiotensinérgicos centrais e periféricos em pombos e mamíferos. Vale reiterar que em mamíferos o pré-tratamento com estes antagonistas (Losartan e PD) reverte o efeito dipsogênico produzido pela administração de Ang II.

Deve ser notado que a intensa ingestão de água produzidas pela Ang II e pela serotonina é acompanhada também por perfis comportamentais pós-ingestivo semelhantes. A administração de Ang II ou de serotonina provocam sono, além disso os animais apresentaram latências igualmente curtas para o início do sono. Este é o primeiro relato indicativo de possível um efeito hipnogênico da Ang II em pombos. No entanto o sono produzido pela administração i.c.v. de serotonina é mais duradouro que o sono produzido pela administração i.c.v. de Ang II. Estes achados podem indicar que embora as duas provoquem sono, os mecanismos hipnogênicos desencadeados pela serotonina podem ser diferentes dos mecanismos hipnogênicos desencadeados pela Ang II.

O pré-tratamento com os 3 diferentes antagonistas de receptores angiotensinérgicos utilizados neste trabalho não bloquearam o efeito hipnogênico produzido pela serotonina, demonstrando que o sono produzido pela serotonina não é mediado por receptores angiotensinérgicos. O sono produzido pela administração de 5-HT em pombos parece ser um fenômeno vinculado a ingestão de água. Achados obtidos por Steffens e cols. (1997) mostram que animais tratados com 5-HT quando privados de água aumentam a duração de exploração e diminuem a duração do sono.

Além disso, o pré-tratamento com os 3 diferentes antagonistas de receptores angiotensinérgicos também não afetaram o sono produzido pela administração central de Ang II, indicando que os mecanismos hipnogênicos possivelmente ativados pela Ang II não contam com a participação de receptores sensíveis à Sar¹-Ala⁸ - Ang II, Losartan ou PD.

Estudos com receptores angiotensinérgicos clonados tem demonstrado que a Sar¹, Ala⁸ - Ang II e Sar¹, Ile⁸ -Ang II são igualmente potentes em se ligarem à receptores angiotensinérgicos de mamíferos (Whitebread e cols., 1989; Dudley e cols., 1991; Murphy e cols., 1992). Contudo, a Sar¹, Ile⁸ -Ang II é mais potente do que a Sar¹, Ala⁸ -Ang II em se ligar a receptores clonados de peru (Murphy e cols., 1993), indicando que talvez a Sar utilizada neste trabalho seja capaz de afetar receptores da Ang II envolvidos na ingestão de água mas não de afetar receptores da Ang II que participem do controle do sono.

O envolvimento de circuitos serotoninérgicos na regulação do sono em mamíferos tem sido extensivamente investigado e demonstrado em

mamíferos (e.g., Jouvet, 1969; Cespuglio, 1992; Bjorkum e Ursin, 1996). Lesões eletrolíticas dos núcleos da rafe, que contém grande parte de corpos celulares de neurônios serotoninérgicos (Dahlstrom e Fuxe, 1964), induzem a uma permanente insônia (Jouvet, 1969; 1972). A administração de inibidores da síntese de serotonina induz a vigília em gatos que é revertida quando se administra compostos que aumentam a liberação de serotonina (Koella e cols., 1968; Petijean e cols., 1980). Informações equivalentes sobre um possível papel de mecanismos serotoninérgicos na regulação do sono em aves limitam-se ao trabalho de Steffens e cols. (1997), atualmente estão sendo conduzidos em nosso laboratório experimentos visando identificar eletrograficamente os estágios e formas do sono induzido pela injeção central de 5-HT em pombos (Vânia M.A.Andriani, comunicação pessoal) e que apontam para uma importante participação de mecanismos serotoninérgicos na indução de estados semelhantes ao sono de ondas lentas neste animal.

O envolvimento de circuitos angiotensinérgicos em mecanismos hipnogénicos tem sido raramente descritos na literatura. Moreira e Krieger, (1988) relatam que a administração i.c.v. de Ang II aumenta a duração do sono paradoxal e o sono de ondas lentas em ratos. Um possível aumento da atividade da Ang II durante o sono é sugerido por experimentos como os de Brandenbergen e cols., (1998), que demonstraram uma maior atividade da renina plasmática em ovelhas dependente de estágios do sono. Adicionalmente, uma possível participação de sistemas angiotensinérgicos em fenômenos cognitivos foi relatada na literatura: inibidores da enzima conversora de angiotensinogênio podem aumentar a performance cognitiva

em ratos e possuem propriedades ansiolítica (Barnes e cols., 1990; Costall e cols., 1989).

Como já relatado anteriormente, o controle da liberação de alguns hormônios, como renina e a vasopressina, estabelece uma conexão entre os sistemas serotoninérgicos e angiotensinérgicos no controle do balanço hidroeletrólítico. Tal interação pode estender-se ao controle do ciclo sono vigília e de eventos endócrinos associados a este ciclo. A liberação de renina durante certos estágios do sono parece estar associada às oscilações da atividade de neurônios serotoninérgicos (Brandenberger e cols., 1996). Estes autores relatam que a administração de agonistas da serotonina promovem a liberação de renina durante o sono de ondas lentas, sugerindo a participação de mecanismos serotoninérgicos sobre a liberação de renina.

Nenhum dos diferentes antagonistas de receptores da Ang II testados no presente trabalho (Sar, Losartan e PD) foi capaz de reverter o sono produzido pela administração de Ang II ou de serotonina. Estes resultados sugerem que o efeito hipnogênico produzido pela serotonina não se deva à ativação de mecanismos angiotensinérgicos bloqueáveis pelos antagonistas utilizados neste trabalho. Os dados sugerem ainda, que tal efeito hipnogênico produzido pela Ang II se deva a interações com receptores angiotensinérgicos não afetados por estes antagonistas. O bloqueio da ingestão de água mas não do sono provocado pela administração de Sar, suportam a idéia que as respostas dipsogênica e hipnogênica provocadas pela injeção i.c.v. de Ang II ou de serotonina são mediadas por diferentes mecanismos fisiológicos.

Em resumo, nossos dados sugerem que a administração de Ang II e de serotonina provocam efeitos dipsogênicos similares e ambas produzem sono. Os resultados mostram ainda que os efeitos dipsogênicos (mas não os hipnogênicos) da serotonina envolvem a ativação de sistemas angiotensinérgicos. Tais efeitos dipsogênicos, tanto da Ang II quanto da serotonina, parecem ser mediados por receptores para a Ang II que apresentam baixa afinidade pelos protótipos de antagonistas AT_1 (Losartan) e AT_2 (PD-123,319).

BIBLIOGRAFIA

ABHOLD R.H. & HARDING J.W. **Metabolism of Angiotensin II and III by membrane-bound peptidase from rat brain**, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 245 (1988) 171-177

BARRACO R., NORMILE H. & MORON M. **Drinking in response to intracranial administration of angiotensin II in the pigeon**. *Pharmac. Res. Commun.* 16 (1984) 41-54

BARNES, J.M. BARNES, N.M., COSTOLL, B., HOROVITZ, Z.P., IRONSIDE, J.W., NAYLOR, R.J. & WILLIAMS, T.J. **Angiotensin II inhibits cortical cholinergic function: implications for cognition**. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 16 (1990) 234-238

BARNEY C.C., THREATTLE R.M., KIKTA D.C. & FREGLY M.J. **Effects of serotonin and L-5-hydroxytryptophan on plasma renin activity in rats**. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 14 (1981) 895-900

BICKERTON R.K. & BUCKLEY J.P.. **Evidence for a central mechanism of angiotensin induced hypertension**. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 106 (1961) 834-837.

BERGSMA D.J., ELLIS C., KUMAR C. NUTHULAGANTI P., KERSTEN H., EISHOURBAGY N., GRIFFIN E., STADEL J.M. & AYIAR N. **Cloning and characterization of a human angiotensin II type-1 receptor**. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 183 (1992) 989-995

BOND R.A., ORNSTEIN A.G. & CLARKE D.E. **Unsurmountable antagonism to 5-hydroxytryptamine in rat kidney results from pseudoirreversible inhibition rather than multiple receptors or allosteric receptor modulation**. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 249 (1989) 401-410.

BJORKUM A.A. & URSIN R. **Sleep/Waking Effects Following Intrathecal Administration of the 5-HT_{1A} Agonist 8-OH-DPAT Alone and in Combination With the Putative 5-HT_{1A} Antagonist NAN-190 in Rats**. *Brain Research*, 39 (1996) 373-379.

BRANDENBERGER G., LUTHRINGER R., MULLER G., GRONFIER C. SCHALTENBRAND N., MACHER J.P., MUZET A. & FOLLENIUS M. **5-HT₂**

- receptors are partially involved in the relationship between renin release and delta relative power. *J. Endocrinol. Invest.* 19 (1996) 556-562
- BULPITT C.J. & FLETCHER A.E. Cognitive function and angiotensin-converting enzyme inhibitors in comparison to other antihypertensive drugs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 19 (suppl.6): (1992) S100-S104
- CAMPBELL D.J.. The site of angiotensin production. *J. Hypertens.* 3 (1985) 199-207.
- CESPUGLIO R., HOUDOUIN F., OULERICH M., EL MANSARI M. & JOUVET M. Axonal and somato-dendritic modalities of serotonin release: their involvement in sleep preparation, triggering and maintenance. *J. Sleep Res.* 1 (1992) 150-154
- COLOMBARI D.S., MENANI J.V. & JOHNSON A.K. Forebrain angiotensin type 1 receptors and parabrachial serotonin in the control of NaCl and water intake. *Am. J. Physiol.* Dec 271:6 Pt 2 (1996) R1470-R1476
- COSTALL, B., COUGHLAN, J., HOROVITZ, Z.P., KELLY, M.E., NAYLOR, R.J. & TOMKINS, D.M. The effects of ACE inhibitors captopril and SQ29,852 in rodent tests of cognition. *Pharm. Biochem. Behav.* 33 (1989) 573-579
- DAHLSTROM A. & FUXE K. Evidence for existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brainstem neurons. *Acta Physiol Scand* 62 [suppl. 232](1964) 1-55
- DE CARO G., MASSI M. & MICOSSI L.G. Dipsogenic effect of angiotensin II, bombesin and tachykinin in the duck. *Pharmac. Biochem. Behav.* 13 (1980) 229-233
- DE CARO G.; MASSI M; MICOSSI; L.G. & PERFUMI M. Angiotensin II antagonists versus drinking induced by bombesin or eleidosin in pigeons. *Peptides*, 3 (1982) 631-636.
- DENBOW D.M. Food and water intake response of turkeys to intracerebroventricular injections of angiotensin II. *Poult. Sci.*, 64 (1985) 1996-2000.

DE PASQUALE M.J., FOSSA A.A., HOLT W.F. & MANGIAPANE M.L. **Central DuP 753 doesn't lower blood pressure in spontaneously hypertensive rats.** *Hypertension*, 19 (1992) 668-671.

DUDLEY D.T., HUBBEL S.E. & SUMMERFELT R.M. **Characterization of angiotensin II (AT2) binding sites in R3T3 cells.** *Mol. Pharmacol.* 40 (1991) 360-367

DUGOVIC C. **Functional activity of 5-HT2 receptors in the modulation of the sleep/wakefulness states.** *J. Sleep Res.* 1 (1992) 163 -167

DZAU V.J.. **Molecular and Physiological aspects of tissue renin-angiotensin system: Emphasis on cardiovascular control.** *J. Hypertens*, 6(suppl 3): (1988), S7-S12

ENDLICH K., KUHN R. & STEINHAUSEN M. **Visualization of serotonin effects on renal vessels of rats.** *Kidney Int.* 43(1993) 314-323

EVERED M.D., & FITZSIMONS J.T. **Drinking induced by angiotensin II in the pigeon (*Columba livia*).** *J. Physiol. (Lond)* 263 (1976) 193P-194P

EVERED M.D. & FITSIMONS J.T. **Drinking and Changes in Blood Pressure in Response to Angiotensin II in the Pigeon *Columba livia*.** *J. Physiol.* 310, (1981a) 337-352

EVERED M.D. & FITZSIMONS J.T. **Drinking and changes in blood pressure in response to precursors, fragments and analogues of angiotensin II in the pigeon *Columba livia*.** *J. Physiol. (Lond)* 310 (1981b) 353-326

FITZSIMONS J.T., A.N. & JOHNSON A.K. **Peptide antagonists of the renin-angiotensin system in the characterization of receptors for angiotensin-induced drinking.** *Brain Res.* 153, (1978) 319-331.

FITZSIMONS J. T. **The Physiology of Thirst and Sodium Appetite.** Monographs of the Physiological Society no.35. (1979) Cambridge: Cambridge University Press

FITZSIMONS J.T. **Angiotensin stimulation of the central nervous system.** *Rev. Physiol. Pharmac.* 87 (1980) 117-167

FREGLY M.J. & ROWLAND N.E. Effect of a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, DuP753, on angiotensin-related water intake in rats. *Brain Res. Bull.*, 27 (1991) 97-100.

FREGLY M.J. & ROWLAND N.E. Effect of DuP 753, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist on the drinking responses to acutely administered dipsogenic agents in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 199 (1992) 158-154

GERSTBERGER R., HEALY D.P. & HAMMEL H.T. Possible role of periventricular angiotensin II receptors in the regulation of salt gland function in saltwater-acclimated ducks. *Wiss. Z. Karl-Marx-Univ. Leipzig* 36 (1987) 192-197

GANTEN D., HUTCHINSON J.S., SCHELLING P., GANTEN U., & FISHER H. The *is*so-renin angiotensin systems in extrarenal tissue. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 3 (1976) 103-106

IWAI N., & INAGAMI T. Identification of two subtypes in the rat type I angiotensin II receptor. *FEBS Lett.* 298 (1992) 257-260

HOGARTY D.C., SPEEKMAN E.A., PUIG V. & PHILLIPS M.I. The role of angiotensin, AT₁ and AT₂ receptors in the pressor, drinking and vasopressin responses to central angiotensin. *Brain Res.*, 586 (1992) 289-294

HUBBARD J.I., LIN N. & SIBBALD J.R. Subfornical organ lesions in rats abolish hyperdipsic effects of isoproterenol and serotonin. *Brain Res. Bull.*, 23 (1989) 41-45

JI H., LEUNG M., ZHANG Y., CATT K.J. & SANDBER K. Differential Structural Requirements for Specific Binding of Nonpeptide and Peptide Antagonists to the AT₁ Angiotensin Receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 24 (1994) 16533-16536

JOUVET M. Biogenic amines and the states of sleep. *Science* 163 (1969) 32-41

JOUVET M. The role of monoamines and acetylcholine containing neurons in the regulation of the sleep-waking cycle. *Ergeb Physiol* 64 (1972) 166-307

JOHNSTON C.I. **Biochemistry and pharmacology of the renin-angiotensin system.** *Drugs*, 39, (1990) 21-31

KAUFMAN S. & PETERS G. **Regulatory drinking in the pigeon *Columba livia*.** *Am. J. Physiol.* 239 (1980) R219-R225

KARTEN H. J. & HODOS W. A. **A stereotaxic atlas of the brain of the pigeon (*Columba livia*),** (1967) Baltimore: Johns Hopkins Press.

KHOSLA M.C., SMEBY R.R. & BUMPUS F.M. **Structure activity relationship in angiotensin II analogs.** *Springer-Verlag* (1974) 126-156

KIKTA D.C., BARNEY C.C., TREATLE R.M., FREGLY M.J., ROWLAND N.E. & GREENLEAF J.E. **On The Mechanism Of Serotonin – Induced Dipsogenesis In The Rat.** *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 19 (1983) 519-525

KIRBY R.F. ; THUNHORST R.L. & JOHNSON A.K. **Effects of a non-peptide angiotensin receptor antagonist on drinking and blood pressure responses to centrally administered angiotensins in the rat.** *Brain Res.* , 576 (1992) 348-350

KOBAYASHI H. & TAKEY Y. **Mechanism for induction of drinking with special reference to angiotensin II.** *Comp. Biochem. Physiol. A* 71 (1982) 485-494

KOELLA W.P., FELSTEIN A. & CZIMAN J.S. **The effects of parachlorophenylalanine on the sleep of cats.** *Electroencephalogr Clin. Neurophysiol* 25 (1968) 481-490

LENKEI Z., PALKOVITS M., CORVOL P. & LLORENS-CORTÉS C. **Expression of Angiotensin Type-1 (AT1) and Type-2 (AT2) Receptor mRNAs in the Adult Rat Brain: A Functional Neuroanatomical Review.** *Frontiers in Neuroendocrinology*, 18 (1997) 383-439

LIND R.W., SWANSON L.W., BRUHN T. O. & GANTEN D. **The distribution of angiotensin II-immunoreactive cells and fibers in the paraventriculo-hypophyseal system of the rat.** *Brain Res.* 338 (1985) 81-89

MASSI M., DE CARO G., MAZZARELLA L. & EPSTEIN A.N. **The role of subfornical organ in the drinking behavior of the pigeon.** *Brain Res.* 381 (1986) 289-299

- MATHAI M.; EVERED M.D. & McKINLEY M.J. **Intracerebroventricular losartan inhibits postprandial drinking in sheep.** *Am. J. Physiol.*, 41: (1997) R1055-R1059
- MEYER D. K.; ABELE M. & HERTING G. **Influence of serotonin on water intake and renin-angiotensin system in the rat.** *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 212 (1974) 130-140
- MENANI J.V. & JOHNSON A.K. **Lateral parabrachial serotonergic mechanisms: angiotensin-induced pressor and drinking responses.** *Am. J. Physiol.* 269 (1995) 1044-1049
- MILANEZ B.C.; FREITAS C.G.; MARINO-NETO J. & PASCHOALINI M.A. **Ações dipsogênicas, hipnogênicas e anorexigênicas da serotonina em pombos. Comparação entre os efeitos da injeção central e periférica.** In: Reunião Anual da Federação das Sociedades de Biologia Experimental, XI, 1996, Caxambu. *Anais...* São Paulo: FESBE, 136 (1996b).
- MONTGOMERY A.M.J., FLETCHER P.J., & BURTON M.J. **Behavioral and pharmacological investigations of 5HT hipophagia and hyperdipsia.** *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 25 (1986) 23-28
- MONTGOMERY A.M.J. & BURTON M.J. **Pharmacological investigations of the mechanisms underlying the effects of peripheral 5-HT on flavor consumption and preference.** *Psychopharmacology* 89 (1986) 192-197
- MOREIRA R.D. & KRIEGER E.M. **Abnormal blood pressure behavior produced by intracerebral angiotensin during natural sleep.** *J. Hypertens Suppl* 6:4 (1988) 452-454
- MURPHY T.J., ALEXANDER R.W., GRIENDLING K.K., RUNGE M.S. & BERNSTEIN K.E. **Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor.** *Nature (Lond.)* 351 (1991) 233-236
- MURPHY T.J., TAKEUCHI K. & ALEXANDER W. **Molecular cloning of AT1 angiotensin receptors.** *Am. J. Hypertens.* 5 (1992) 236S-242S
- MURPHY T.J., NAKAMURA Y., TAKEUCHI K. & ALEXANDER R.W. **A cloned angiotensin receptor isoform from the turkey adrenal gland is pharmacologically distinct from mammalian angiotensin receptors.** *Mol. Pharmacol.* 44 (1993) 1-7

- NAKAYAMA T., NAKAJIMA T. & SOKABE H. **Comparative studies on angiotensins III. Structure of fowl angiotensin and its identification by DNS-method.** *Chem. Pharmac. Bull.* 21 (1973) 2085-2087
- NATKE C.; RÜDIGER G. & GROSSMANN R. **Angiotensin II-binding sites in chicken brain and pituitary: autoradiographic localization.** *Cell & Tissue Research*, 283 (1996) 297-303
- NISHIMURA H., WALKER E., PATTON C.M., MADISON A.B., CHIU A.T. & KEISER J. **Novel angiotensin receptor subtypes in fowl.** *Am. Physiol. Soc.* 267 (1994) R1174-R1181
- PETIJEAN F., BUDA C., JANIN M., SALLANON M. & JOUVET M. **L'insomnie provoquée par la para-chlorophénylalanine chez le cat. Sa réversibilité par l'injection intraventriculaire d'indolamines.** *CR Acad Sci* 291 (1980) 1063-1066
- PHILLIPS M. I. **Angiotensin in the brain.** *Neuroendocrinology* 25, (1978) 354-377
- REIS L.C., RAMALHO M.J.P. & ANTUNES-RODRIGUES J. **Central serotonergic modulation of drinking behavior induced by water deprivation: Effect of a serotonergic agonist (MK -212) administered intracerebroventricularly.** *Braz. J. Med. Biol. Res.* 23 (1990a) 1335-1338
- REIS L.C., RAMALHO M.J.P. & ANTUNES-RODRIGUES J. **Central serotonergic modulation of drinking behavior induced by angiotensin II, and carbachol in normally hydrated rats: Effect of intracerebroventricular injection of MK-212.** *Braz. J. Med. Biol. Res.* 23 (1990b) 1339-1342
- RITTENHOUSE P.A., BAKKUM E.A. & VAN de KAR L.D. **Evidence that the serotonin agonist, DOI, increases renin secretion and blood pressure through both central and peripheral 5-HT₂ receptors.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259 (1991) 163-167
- ROWE B.P., SAYLOR D.L. & SPETH R.C. **Analysis of angiotensin II receptor subtypes in individual rat brain nuclei.** *Neuroendocrinology*, 55(1992) 563-573

- ROWLAND N.E., CAPUTO F.A. & FREGLY M.J. **Water intake induced in rats by serotonin and 5-hydroxytryptophan: different mechanisms?** *Brain Res. Bull.* 18 (1987) 501-508
- ROWLAND N.E. & FREGLY M.J. **Brain angiotensin AT₂ receptor antagonism and water intake,** *Brain Res. Bull.* 32 (1993) 391-394
- ROWLAND N.E., ROZELLE A., RILEY P.J. & FREGLY M.J. **Effect of nonpeptide angiotensin receptor antagonists on water intake and salt appetite in rats,** *Brain Res. Bull.*, 29 (1992) 389-393
- SAAVEDRA J.M. **Brain and pituitary angiotensin,** *Endocr. Rev.*, 13: (1992) 329-380
- SAKURA H., KOBAYASHI H., MIZUTANI S., SAKURA N., HASHIMOTO T. & KAWASHIMIA Y. **Kinetic Properties of Placental Aminopeptidase A: N-terminal degradation of Angiotensin II.** *Biochem. Int.*, 6, (1983) 609-615
- SANDBERG K., JI H., MILAN M.A. & CATT K.J. **Amphibian myocardial angiotensin II receptors are distinct from mammalian AT₁ and AT₂ receptor subtypes.** *FEBS Lett.* 284 (1991) 281-284
- SASAKI K., YAMANO Y., BARDHAN S., IWAI N., MURRY J.J., HASEGAWA M., MATSUDA Y. & INAGAMI T. **Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1 receptor.** *Nature (Lond.)* 351 (1991) 230-233
- SASAMURA H., HEIN L., KRIEGER J.E., PRATT R.E., KOBLIKA B.K. & DZAU V.J. **Cloning, characterization and expression of two angiotensin receptor (AT-1) isoforms from the mouse genome.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185 (1992) 253-259
- SAYDOFF J.A., RITTENHOUSE P.A., CARNES M., ARMSTRONG J., VAN DE KAR L.D. & BROWNFIELD M. S. **Neuroendocrine and cardiovascular effects of serotonin: selective role of brain angiotensin on vasopressin.** *American J. of Physiol.*, 270 (1996) 513-521
- SCHOWB J.B. & JOHNSON A.K. **Angiotensin-induced dipsogenesis in domestic fowl (*Gallus gallus*)** *J. comp. Physiol. Psychol.* 91 (1977) 182-188

- SIMANSKY K.J., BOURBONNAIS K.A. & SMITH G.P. **Abdominal vagotomy reduces the dipsogenic but not the anorexic action of systemic serotonin in rats.** *Soc. Neurosci. Abstr.* 8 (1982) 605-609
- SIMON E.; GERTSBERGER R. & GRAY D.A. **Central nervous angiotensin II responsiveness in birds.** *Prog. Neurobiol.*, 39 (1992) 179-207
- SIMPSON J. B., EPSTEIN A. N. & CAMARDO J. S. **Localization of receptors for the dipsogenic action of angiotensin II in subfornical organ of the rat.** *J. comp. Physiol. Psychol.* 92: (1978) 581-608
- SKEGGS L., KAHN J.R. & SCHUMWAY N.P. **The preparation and function of the hypertensin converting enzyme.** *J. Exp. Med.*, 103, (1956) 295-299
- SNAPIR N., ROBINSON B. & GOLDSCHALK M. **The drinking response of the chicken to peripheral and central administration of angiotensin II.** *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 5 (1976) 5-10
- SPETH R.C., WAMSLEY J.K., GEHLERT D.R., CHENICKY C.L., BARNES K.L. & FERRARIO C.M. **Angiotensin II receptor localization in the canine CNS.** *Brain Res.*, 326 (1985) 137-143
- STEFFENS S. M.; CASAS D.C.; MILANEZ B. C.; FREITAS C.G.; PASCHOALINI M.A. & MARINO-NETO J. **Hypophagic and dipsogenic effects of central 5-HT injections in pigeons.** *Brain Res. Bull.*, 44 : (1997) 681-688
- SWANSON L. W. The hypothalamus. In: A. Björklund, T. Hökfelt and L. W. Swanson (Eds). *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, Vol. 5. **Integrated Systems of the CNS**, Part I, Elsevier, Amsterdam, (1987) 101-110
- TAKEY Y. **Angiotensin and water intake in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*).** *Gen. Comp. Endocr.* 31 (1977a) 364-372
- TAKEY Y. **The role of the subfornical organ in drinking induced by angiotensin in the Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*.** *Cell Tissue Res.* 185 (1977b) 175-181
- TAKAHASHI T., HISA H. & SATOH S. **Serotonin-induced renin release in the dog kidney.** *Eur. J. Pharmacol.* 193 (1991) 315-320

- THRASHER T.N., SIMPSON J.B. & RAMSAY D.J. Lesions of the subfornical organ block angiotensin-induced drinking in the dog. *Neuroendocrinology* 35 (1982) 68-72
- TIMMERMANS P.B., WONG P.C. CHIU A.T., HERBLIN W.F., BENFIELD P. CARINI D.J., LEE R.J., WEXLER R.R., SAYE J.A. & SMITH R.D. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptors antagonists, *Pharmacol. Rev.*, 45 (1993) 205-251
- TSUTSUMI K., VISWANATHAN M., STRÖMBERG C. & SAAVEDRA J.M. Type – 1 and type –2 angiotensin II receptors in fetal rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 198 (1991) 89-92
- UNGER T., BADOER E., GANTEN D., LANG R.E. & RETTIG R. Brain angiotensin: pathways and pharmacology, *Circulation*, 77(Suppl. I) (1988) 140-154
- VAN de KAR L., CARNES M., MASLOWSKI R.J., BONADONNA A.M., RITTENHOUSE P.A., KUNIMOTO K., PIECHOWSKY R.A. & BETHEA C.L. Neuroendocrine evidence for denervation super-sensitivity of serotonin receptors: effects of the 5-HT agonist RU 24969 on corticotropin, corticosterone, prolactin and renin secretion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 251 (1989) 428-503
- WADA M., KOBAYASHI H & FARNER D.S. Induction of drinking in the white-crowned sparrow, *Zonotrichia leucophrys gambeli*, by intracranial injection of angiotensin II. *Gen. Comp. Endocr.* 26 (1975) 192-197
- WHITEBREAD S., MELE M., KAMBER B. & deGASPARO M. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163 (1989) 284-291
- WIDDOP R.E., GARDINER S.M. & BENNET T. Effects of angiotensin II AT1 or AT2 – receptor antagonists on drinking evoked by angiotensin II or water deprivation in rats. *Brain Res.*, 648 (1994) 46-52
- WONG P.C., HART S.D., ZASPEL A., CHIU A.T., SMITH R.D. & TIMMERMANS P.B.M.W. Functional studies of nonpeptide angiotensin II receptor subtype-specific ligands: DuP 753 (All-1) and PD123177 (All-2). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255 (1990) 584-592

WRIGHT J.W. & HARDING J.W., Regulatory role of brain angiotensin in the control of physiological and behavioral responses. *Brain Res. Rev.*, 17 (1992) 227-262

WRIGHT J.W. & HARDING J.W. Brain angiotensin receptor subtypes AT1, AT2 and AT4 and their functions. *Reg. Peptides*, 59 (1995) 269-295

WRIGHT, J.W. & HARDING, J.W. Important roles for angiotensin III and IV in the brain renin-angiotensin system. *Brain Res. Rev.*, 25 (1997) 96-124